

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena D. Milojević

**EKSPRESIJA GENA ZA  
RIBOZOM-INKTIVIRAJUĆI PROTEIN  
(*SoRIP2*) KAO MARKER ZA ANALIZU  
EMBRIOGENOG POTENCIJALA  
SPANACA (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador)  
*in vitro***

doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena D. Milojević

**EXPRESSION OF GENE ENCODING  
RIBOSOME-INACTIVATING PROTEIN  
(*SoRIP2*) AS A MARKER FOR THE  
ANALYSIS OF SPINACH (*Spinacia oleracea*  
L. cv. Matador) EMBRYOGENIC  
POTENTIAL *in vitro***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

**Mentori:**

**Viši naučni saradnik dr Snežana Zdravković-Korać**

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

---

**Naučni saradnik dr Jelena Savić**

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

---

**Član komisije:**

**Vanredni profesor dr Aneta Sabovljević**

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

---

**Datum odbrane:**

*Eksperimentalni deo doktorske teze urađen je u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" Univerziteta u Beogradu.*

*Svom mentoru, dr Snežani Zdravković-Korać, dugujem neizmernu zahvalnost za sve čemu me je naučila, kao i za poverenje i podršku pruženu tokom svih ovih godina.*

*Dr Jeleni Savić, svom mentoru, želim da zahvalim na velikoj pomoći u oblikovanju teze, posebno u vezi sa molekularnim istraživanjima, kao i na razumevanju i podsticajima tokom zajedničkog rada.*

*Srdačno se zahvaljujem dr Aneti Sabovljević na trudu uloženom u pregled teze, korisnim kritikama i angažovanju na Biološkom fakultetu u toku realizacije ove teze.*

*Svom šefu, dr Branki Vinterhalter, želim da zahvalim na ukazanoj prilici da budem deo njenog tima i ovih interesantnih istraživanja.*

*Dr Slađani Todorović i dr R.P. Pharis (Univerzitet u Kalgariju), zahvaljujem na ustupljenim hemikalijama i korisnim smernicama u tumačenju rezultata vezanih za gibereline.*

*Dr Milanu Dragičeviću zahvaljujem na prenesenom znanju vezanom za dizajniranje prajmera.*

*Dr Neveni Mitić, dr Dušici Čalić, dr Aleksandru Cingelu i dr Branki Uzelac veliko hvala za spremnost da mi uvek pomognu korisnim savetima, zanimljivim diskusijama i lepom reči.*

*Ljiljani Tubić zahvaljujem na energiji i trudu uloženom u početne eksperimente ove teze, kada je možda bilo i najteže.*

*Veliku zahvalnost dugujem Žarku Milojeviću na pomoći oko statističke obrade podataka, ali i na uvek inspirativnim raspravama koje traju još od detinjstva.*

*Mojim dragim kolegicama, Nini Devrnji i Dragani Antonić, hvala što su uvek bile tu za mene.*

*Slobodanu Milojeviću, Predragu Milosavljeviću i Marku Mičiću neizmerno hvala za pomoć u grafičkom predstavljanju rezultata, ali i za većitu inspiraciju koju mi pružaju.*

*Svim kolegama i kolegicama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka hvala na kolegijalnosti, podršci i prijatnim trenucima koji su rad u laboratorijama učinili lakšim.*

*Svojim roditeljima, Biljani i Dragoljubu, hvala na svemu što su mi pružili. Njima je ova teza i posvećena.*

**Ekspresija gena za ribozom-inaktivirajući protein (*SoRIP2*) kao marker za analizu embriogenog potencijala spanaća (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) *in vitro***

**REZIME**

Somatska embriogeneza je indukovana iz apikalnih fragmenata lateralnih korenova spanaća (*Spinacia oleracea* L.) sorte "Matador", gajenih u uslovima *in vitro* na indukcionom Murashige & Skoog medijumu koji je sadržao 20  $\mu$ M  $\alpha$ -naftilsirćetnu kiselinu (NAA) i 5  $\mu$ M giberelnu kiselinu ( $GA_3$ ). Embriogeni potencijal je testiran na 30 nasumično odabranih klijanaca. Rezultati ukazuju da je regenerativni potencijal individualnih klijanaca bio vrlo varijabilan; sa frekvencom regeneracije od 0.3% do 100% i prosečnim brojem somatskih embriona (SE) po eksplantatu od 0.001 do 9.96. Samo 4 od 30 linija su imale visoku frekvencu regeneracije (85-100%), sa ukupno 227-347 SE regenerisanih sa 30 odsečaka korenova tokom 12 nedelja gajenja. Tokom prve subkulture (4 nedelje) regenerisala je samo jedna linija. Rezultati ukazuju da su jedinke sa visokim regenerativnim potencijalom retke u populaciji sorte "Matador".

SE izolovani sa korenova istog klijanca su gajeni kao jedna linija na medijumu sa 5  $\mu$ M kinetinom. Sa klijanaca čiji su korenovi korišćeni za indukciju regeneracije paralelno su izolovani i apikalni pupoljci i gajeni pojedinačno, u epruvetama na medijumu bez regulatora rastjenja (BRR). Biljke koje su se razvile iz apikalnih izdanaka klijanaca i iz SE su se samooprašile i dale semena u uslovima *in vitro*. Na ovaj način, samooplođenjem *in vitro* i isključivanjem sakupljenog semena, dobijene su 4 generacije potomačkih klijanaca označenih kao S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub>. Korenovi ovih klijanaca su korišćeni za indukciju regeneracije SE i njihov embriogeni potencijal je upoređen sa roditeljskim. Embriogeni potencijal S<sub>1</sub> i S<sub>2</sub> linija je bio takođe vrlo varijabilan. Selekcijom potomstva sa najvećim embriogenim potencijalom dobijene su tri S<sub>3</sub> i jedna S<sub>4</sub> linija sa izuzetno visokim embriogenim potencijalom, koji je bio 33-53 puta veći u odnosu na majku-biljku. Frekvencija regeneracije ovih linija se kretala oko 100%, a sa 30 fragmenata korenova je izolovano ukupno 1339-2181 SE po klijancau tokom 12 nedelja. Sve linije su regenerisale tokom prve subkulture, 2-4 nedelje ranije u odnosu na roditeljsku liniju. Fragmenti korenova izolovani sa biljaka koje su se razvile iz SE (regeneranti) su imali sličan regenerativni kapacitet

klijancu sa kog su indukovani. Ova istraživanja su pokazala snažan uticaj genotipa na nivou individue na embriogeni potencijal spanaća.

U daljim istraživanjima je testiran uticaj svetlosti i egzogenih giberelina (GA) na genetički identičnom materijalu, da bi se eliminisao uticaj genotipa na procenu embriogenog potencijala. Svetlost u smislu trajanja (fotoperiod) i gustine fluksa fotona je značajno uticala na efikasnost somatske embriogeneze. Eksplantati svih testiranih linija su pokazali veći embriogeni potencijal u uslovima dugog dana (DD, 16h svetlost) nego u uslovima kratkog dana (KD, 8h svetlost), dok je 7 od 40 linija regenerisalo samo u uslovima DD. Osim toga, regeneracija je započinjala oko 4 nedelje ranije u uslovima DD. Maksimalan embriogeni potencijal kod svih testiranih linija je zabeležen pri gustini fluksa fotona od  $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .

Egzogeni giberelini ( $\text{GA}_1$  i  $\text{GA}_3$ ) su takođe značajno uticali na embriogeni potencijal, pri čemu je  $\text{GA}_3$  imao izraženiji efekat na indukciju somatske embriogeneze od  $\text{GA}_1$ . Većina linija nije regenerisala u odsustvu GA, a u odsustvu GA i u mraku je regenerisala samo jedna linija sa izuzetno niskim embriogenim potencijalom. Pokazan je snažan sinergistički uticaj auksina (NAA), GA i svetlosti na indukciju somatske embriogeneze spanaća. Nedostatak bilo kog faktora je izazivao veliki pad embriogenog potencijala eksplantata.

Najveći broj linija dobijenih u ovom radu su imale stabilan embriogeni potencijal tokom ograničenog vremenskog perioda, najviše godinu dana. U cilju skraćjenja perioda za procenu regenerativnog potencijala pojedinačnih linija, razvijen je model-sistem za brzu i preciznu determinaciju embriogenog potencijala praćenjem ekspresije gena koji kodira ribozom-inaktivirajući protein spanaća (*SoRIP2*). Ekspresija ovog gena je bila na niskom bazalnom nivou u korenovima spanaća pod neinduktivnim uslovima, da bi bila 285 puta veća u globularnim SE i zatim opala na nivo kontrole u  $\text{SE} > 5\text{mm}$  na kotiledonarnom stupnju razvića. Ekspresija *SoRIP2* je analizirana 4 nedelje od početka indukcionog tretmana, pre nego što se SE mogu uočiti pomoću stereomikroskopa. Za procenu embriogenog potencijala kod istih linija konvencionalnom kvantifikacijom bilo je potrebno 12 nedelja. Pokazan je visok stepen pozitivne korelacije ( $r^2=0.81$ ) između ekspresije *SoRIP2* i embriogenog potencijala, što ukazuje da se ekspresija *SoRIP2* može uspešno

koristiti za procenu embriogenog potencijala spanaća, 8 nedelja ranije nego konvencionalnom metodom.

Izolovani apikalni odsecci korenova spanaća su sposobni za percepciju svetlosti i biosintezu GA posle 4 nedelje tretmana. Analizom ekspresije ključnih gena za anabolizam (*SoGA20-ox1* i *SoGA3-ox1*) i katabolizam (*SoGA2-ox1*) GA, u eksplantatima korenova pod induktivnim uslovima je pokazano da je embriogeni potencijal u korelaciji sa supresijom gena za anabolizam GA i indukcijom ekspresije gena za katabolizam GA. Kod linija spanaća sa višim embriogenim potencijalom je uočena izraženija supresija gena za anabolizam GA. Ova analiza ukazuje da je interakcija auksina, svetlosti i egzogenih GA uzrokovala pokretanje katabolizma GA i da je embriogeni potencijal u korelaciji sa ovim fiziološkim stanjem eksplantata. Rezultati ovog rada su dobra osnova za dalje istraživanje molekularnog mehanizma indukcije somatske embriogeneze upotrebom kolekcije genotipova i model-sistema koji je razvijen tokom ovih istraživanja.

**Ključne reči:** *Spinacia oleracea*, genotip, somatska embriogeneza, fotoperiod, intenzitet svetlosti, gibereolini, *SoRIP2*, *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1*, *SoGA2-ox1*, molekularni markeri, ekspresija gena.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija biljaka

**UDK brojevi :** 577.21:581.1:635.41(043.3)

**Expression of gene encoding ribosome-inactivating protein (*SoRIP2*) as a marker for the analysis of spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) embryogenic potential *in vitro***

**ABSTRACT**

Somatic embryogenesis was induced from apical sections of the lateral roots of spinach seedlings (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador), cultivated *in vitro* on Murashige & Skoog induction medium supplemented with 20 $\mu$ M  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) and 5  $\mu$ M gibberellic acid (GA<sub>3</sub>). The capacity for somatic embryo formation was tested in 30 randomly chosen seedlings (lines). Results indicated that the regeneration potential is very variable among the seedlings, with the frequency of regeneration ranging from 0.3% to 100% and the mean somatic embryo (SE) number per explant ranging from 0.001 to 9.96. Only 4 out of 30 lines displayed high regeneration frequency (85-100%), with the total number of 227-347 SEs regenerated from 30 root sections over a 12-week period. Only one line regenerated during the first subculture (4 weeks). Results indicate that the lines with high embryogenic potential are very rare within the population of cultivar "Matador".

SEs isolated from a single seedling were maintained as a line on medium with 5 $\mu$ M kinetin. Apical shoots, isolated from the same seedlings, which have been used for the induction of regeneration, were cultivated separately in test tubes, on plant growth regulator-free medium. Plants derived from seedlings' apical shoots and SEs flowered, self-fertilised and set seeds *in vitro*. Thus, four generations of descendent seedlings, designated as S<sub>1</sub>-S<sub>4</sub>, were obtained by self-fertilisation and germination of the collected seeds *in vitro*. Roots of these seedlings were used for the induction of SE regeneration and their embryogenic capacities were compared to parental lines. The embryogenic capacities of S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub> lines were also very variable. By selection of offspring with high embryogenic response and through further cycles of self-fertilisation, three S<sub>3</sub> and one S<sub>4</sub> line with extremely high embryogenic capacities, 33-35 fold higher than in the mother-plant, were obtained. The regeneration frequencies of these lines were approximately 100%, and 1339-2181 SEs were isolated from 30 root sections per seedling over a 12-week period. All lines regenerated during the first subculture, and 2-4 weeks earlier compared to parental lines. Root sections of plants regenerated from SE (regenerants) exhibited similar



regeneration capacity as the respective seedling from which they originated. The results indicate that the regeneration capacity of spinach is strongly influenced by the genotype at the individual plant level.

In further studies, the impact of light and exogenous gibberellins (GA) was tested on genetically identical material in order to eliminate the influence of the genotype on the assessment of the regeneration capacity. Light, in terms of duration (photoperiod) and photon flux density, significantly affected the efficiency of somatic embryogenesis. Explants of all tested lines exposed to long day conditions (LD, 16h light) showed higher embryogenic capacity compared to those exposed to short day conditions (SD, 8h light). In addition, 7 out of 40 lines regenerated only with LD, and the regeneration started approximately 4 weeks earlier with LD than with SD. The highest embryogenic capacity was recorded at  $100\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$  in all tested lines.

Exogenous GA ( $\text{GA}_1$  and  $\text{GA}_3$ ) significantly affected embryogenic capacity as well, with  $\text{GA}_3$  being more effective than  $\text{GA}_1$ . Most of the lines did not regenerate in the absence of GA, while in the absence of both GA and light, only one line regenerated, but with extremely low embryogenic capacity. Strong synergistic influence of auxin (NAA), GA and light on the induction of somatic embryogenesis has been demonstrated. The lack of any of these factors caused a sharp decrease of the explants' embryogenic capacity.

The vast majority of lines obtained in the present study displayed a stable embryogenic capacity during a limited period of time, a maximum of one year. In order to shorten the period of individual lines' embryogenic capacity assessment, a model-system for rapid and precise determination of embryogenic capacity was developed. This model-system included the monitoring of expression of a gene encoding spinach ribosome-inactivating protein (*SoRIP2*). The expression of this gene was at a low basal level in the roots grown under non-inductive conditions, and it increased 285-fold in globular SEs, but then dropped to the control level in the cotyledonary stage (SEs > 5mm). The expression of *SoRIP2* was analyzed 4 weeks following the start of the induction treatment, before SE could be seen with the aid of a stereomicroscope. Using the same lines, the determination of embryogenic capacity by conventional quantification took 12 weeks. A high positive correlation ( $r^2=0.81$ ) between the expression of *SoRIP2* and the

index of embryogenic capacity was demonstrated. The results indicate that the expression of *SoRIP2* could be successfully used to evaluate the regeneration capacity of spinach, even 8 weeks earlier than by the conventional method.

Isolated apical root sections of spinach were capable of light perception and GA biosynthesis following 4 weeks of treatment. The expression of the key genes involved in GA anabolism (*SoGA20-ox1* and *SoGA3-ox1*) and catabolism (*SoGA2-ox1*), tested under inductive conditions, revealed that the embryogenic capacity correlated with the suppression of GA anabolism and the induction of GA catabolism. The more pronounced suppression of GA anabolism was observed in lines with higher embryogenic capacities. The analysis suggested that the interaction of auxins, light and exogenous GA promoted GA catabolism and the embryogenic capacity correlated with this physiological state of the explants.

The results of this thesis are a good basis for further research on the molecular mechanism underlying the initiation of somatic embryogenesis, using the collection of genotypes and the model-system developed during this research.

**Key words:** *Spinacia oleracea*, genotype, somatic embryogenesis, photoperiod, light intensity, gibberellins, *SoRIP2*, *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1*, *SoGA2-ox1*, molecular markers, gene expression.

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Plant physiology

**UDC numbers:** 577.21:581.1:635.41(043)

## SADRŽAJ

### SKRAĆENICE

1.	UVOD .....	1
1.1.	Morfogeneza <i>in vitro</i> .....	1
1.1.1.	Mikropropagacija .....	1
1.1.2.	Organogeneza.....	2
1.1.3.	Somatska embriogeneza.....	4
1.1.3.1.	Sličnosti i razlike između zigotske i somatske embriogeneze.....	5
1.1.3.2.	Indukcija i razviće somatskih embriona.....	6
1.1.3.3.	Mehanizam indukcije somatske embriogeneze.....	8
1.1.3.4.	Faktori koji utiču na somatsku embriogenezu.....	9
1.1.3.5.	Molekularni aspekti somatske embriogeneze.....	17
1.1.3.6.	Molekularni markeri specifični za somatsku embriogenezu.....	18
1.1.4.	Androgeneza i ginogeneza .....	22
1.2.	Interakcija svetlosti, auksina i giberelina u promociji morfogeneze biljaka.....	24
1.2.1.	Percepcija svetlosti.....	25
1.2.2.	Uticaj svetlosti na biosintezu i transport auksina.....	26
1.2.3.	Biosinteza i metabolizam giberelina .....	27
1.2.4.	Interakcija svetlosti i giberelina .....	29
1.2.5.	Uticaj svetlosti na biosintezu giberelina .....	32
1.2.6.	Interakcija giberelina sa drugim fitohormonima.....	32
1.2.7.	Prostorna i vremenska distribucija giberelina .....	35
1.2.8.	Uticaj giberelina na proliferaciju, ekspanziju i diferencijaciju ćelija .....	37
1.3.	Spanać ( <i>Spinacia oleracea</i> L.) .....	38
1.3.1.	Regeneracija spanaća <i>in vitro</i> .....	39
1.3.2.	Faktori koji utiču na regeneraciju spanaća <i>in vitro</i> .....	40
1.3.3.	Ekspresija gena spanaća .....	43
1.4.	Ribozom inaktivirajući proteini - RIP.....	44
1.4.1.	Ribozom inaktivirajući proteini spanaća.....	46

2.	<b>CILJEVI RADA</b> .....	49
3.	<b>MATERIJAL I METODE</b> .....	51
3.1.	Biljni materijal .....	51
3.1.1.	Uspostavljanje <i>in vitro</i> kulture spanaća .....	51
3.1.2.	Bazalni medijum za gajenje spanaća .....	51
3.1.3.	Uslovi gajenja <i>in vitro</i> kultura spanaća.....	52
3.2.	Testiranje regenerativnog potencijala korenova spanaća.....	52
3.2.1.	Procedura za indukciju regeneracije iz odsečaka korenova.....	52
3.2.2.	Uspostavljanje kolekcije genotipova i analiza njihovog regenerativnog potencijala .....	52
3.2.3.	Poređenje regenerativnog potencijala korenova klijanaca i regeneranata .....	53
3.2.4.	Uticaj fotoperioda i intenziteta svetlosti na regenerativni potencijal.....	54
3.2.5.	Uticaj egzogenih giberelina i prisustva svetlosti na regenerativni potencijal .....	54
3.2.6.	Uticaj higromicina na regenerativni potencijal .....	55
3.2.7.	Statistička analiza podataka koji se odnose na regenerativni potencijal.....	55
3.3.	Analiza ekspresije gena potencijalnih markera somatske embriogeneze i gena uključenih u metabolizam giberelina spanaća.....	56
3.3.1.	Analiza ekspresije gena.....	56
3.3.1.1.	Izolacija ukupnih RNK.....	56
3.3.1.2.	Reverzna transkripcija (RT) RNK molekula.....	59
3.3.1.3.	Reakcija lančanog umnožavanja (PCR) .....	59
3.3.1.4.	Određivanje nivoa ekspresije gena metodom kvantitativnog RT-PCR (qRT-PCR).....	60
3.3.2.	Uspostavljanje model-sistema za praćenje somatske embriogeneze spanaća molekularnim markerima .....	62
3.3.2.1.	Odabir pouzdanog molekularnog markera za praćenje somatske embriogeneze.....	62
3.3.2.2.	Utvrđivanje korelacije regenerativnog potencijala korenova klijanaca i ekspresije <i>SoRIP2</i> .....	64
3.3.2.3.	Uticaj fotoperioda na ekspresiju <i>SoRIP2</i> .....	64

3.3.3. Analiza ekspresije gena za metabolizam giberelina kod spanaća.....	65
3.3.3.1. Ekspresija gena za metabolizam giberelina u izolovanim fragmentima korenova.....	65
3.3.3.2. Uticaj fotoperioda na ekspresiju <i>SoGA20-ox1</i> , <i>SoGA3-ox1</i> i <i>SoGA2-ox1</i> ...	66
3.3.3.3. Uticaj egzogenih giberelina na ekspresiju <i>SoGA20-ox1</i> , <i>SoGA3-ox1</i> i <i>SoGA2-ox1</i> .....	66
3.3.4. Statistička analiza podataka dobijenih ispitivanjem ekspresije gena.....	67
4. <b>REZULTATI</b> .....	68
4.1. Regenerativni potencijal spanaća.....	68
4.1.1. Regenerativni potencijal P klijanaca.....	68
4.1.2. Formiranje semena <i>in vitro</i> .....	71
4.1.3. Regenerativni potencijal S klijanaca.....	72
4.1.4. Poređenje regenerativnog potencijala korenova klijanaca i regeneranata .....	77
4.1.5. Uticaj fotoperioda na regenerativni potencijal korenova .....	79
4.1.6. Uticaj intenziteta svetlosti na regenerativni potencijal korenova .....	82
4.1.7. Uticaj egzogenih giberelina na regenerativni potencijal korenova.....	84
4.1.8. Uticaj higromicina na regenerativni potencijal korenova .....	86
4.1.8.1. Uticaj higromicina na indukciju somatske embriogeneze .....	86
4.1.8.2. Tolerancija SE na higromicin i indukcija sekundarne somatske embriogeneze.....	91
4.2. Ekspresija gena potencijalnih markera somatske embriogeneze i gena uključenih u metabolizam giberelina spanaća .....	93
4.2.1. Izbor molekularnih markera za praćenje somatske embriogeneze spanaća.....	93
4.2.1.1. Ekspresija <i>SoRIP1</i> i <i>SoRIP2</i> tokom razvića somatskih embriona.....	93
4.2.1.2. Korelacija između regenerativnog potencijala korenova klijanaca i ekspresije <i>SoRIP2</i> gena.....	95
4.2.1.3. Uticaj fotoperioda na ekspresiju <i>SoRIP2</i> gena.....	97
4.2.2. Ekspresija ključnih gena za metabolizam giberelina u apikalnim fragmentima lateralnih korenova .....	99

4.2.2.1. Uticaj fotoperioda na ekspresiju <i>SoGA20-ox1</i> , <i>SoGA3-ox1</i> i <i>SoGA2-ox1</i> .....	101
4.2.2.2. Uticaj egzogenih giberelina na ekspresiju <i>SoGA20-ox1</i> , <i>SoGA3-ox1</i> i <i>SoGA2-ox1</i> .....	102
5. <b>DISKUSIJA</b> .....	104
5.1. Regenerativni potencijal korenova spanača .....	104
5.1.1. Procedura za regeneraciju .....	104
5.1.2. Regenerativni potencijal P-klijanaca .....	105
5.1.3. Formiranje semena <i>in vitro</i> .....	105
5.1.4. Regenerativni potencijal S klijanaca.....	107
5.1.5. Poređenje regenerativnog potencijala korenova klijanaca i regeneranata .....	109
5.1.6. Uticaj fotoperioda na regenerativni potencijal korenova .....	110
5.1.7. Uticaj intenziteta svetlosti na regenerativni potencijal korenova .....	112
5.1.8. Uticaj egzogenih giberelina na regenerativni potencijal korenova .....	113
5.1.9. Uticaj higromicina na regenerativni potencijal korenova .....	114
5.2. Ekspresija <i>SoRIP2</i> tokom somatske embriogeneze .....	115
5.3. Interakcija svetlosti i giberelina .....	120
5.3.1. Uticaj fotoperioda na ekspresiju ključnih gena za metabolizam giberelina.....	120
5.3.2. Uticaj egzogenih giberelina na ekspresiju ključnih gena za metabolizam giberelina.....	124
5.3.3. Sinergistički efekat svetlosti, auksina i giberelina na promociju embriogenog potencijala .....	125
6. <b>ZAKLJUČCI</b> .....	130
7. <b>LITERATURA</b> .....	133
<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b> .....	185

**Prilog 1** – Izjava o autorstvu

**Prilog 2** – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije

**Prilog 3** – Izjava o korišćenju

## SKRAĆENICE

ABA	Apscisinska kiselina
ABI 3	eng. ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3
AGL15/18	eng. AGAMOUS LIKE 15/18
AHK4	eng. ARABIDOPSIS HISTIDIN KINASE 4
ANOVA	Analiza varijanse
ARR	eng. ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR
ATP	Adenozin trifosfat
BAP	N <sup>6</sup> -benzilaminopurin
BBM	eng. BABYBOOM
BZR1	eng. BRASSINAZOLE RESISTANT 1
cDNK	Komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina
CLV1	eng. CLAVATA1
COP1	eng. CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1
CPPU	N-(2-hloro-4-piridil)-N'-fenilurea
CPS	<i>ent</i> -kopalil difosfat sintaza
CRD	eng. Completely Randomized Design
CTAB	Cetiltrimetilamonijum
CUC1	eng. CUP-SHAPED COTYLEDON 1
2,4-D	2,4-dihlorfenoksi sirćetna kiselina
DD	Dugi dan (16h svetlosti)
DEPC	Dietilpirokarbonat
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
dNTP	2'-dezoksi-nukleozid-5'-trifosfat
DTT	Ditiotreitol
ECP	eng. EMBRIOGENIC CELL PROTEIN
EL1	eng. EARLY FLOWERING 1
EPP	eng. ENHANCED PHOTOMORPHOGENIC 1
ESR1	eng. ENHANCER OF SHOOT REGENERATION
Fe-EDTA	Fe-etilendiamintetrasirćetna kiselina

FUS3	eng. FUSCA 3
GA	Giberelin
GA20-ox	Giberelin-20-oksidaza
GA3-ox	Giberelin-3-oksidaza
GA2-ox	Giberelin-2-oksidaza
GGPP	Geranilgeranil-pirofosfat
GH3	eng. Gretchen Hagen 3
GID1	eng. GA INSENSITIVE DWARF 1
GLP	eng. GERMIN-LIKE PROTEIN
GST	Glutation-S-transferaza
HLH	eng. Helix-Loop-Helix
HSP	Proteini toplotnog stresa (eng. HEAT SHOCK PROTEIN)
HY5	eng. LONG HYPOCOTYL 5
IAA	Indol-3-sirćetna kiselina
IAA30	eng. AUXINE RESPONSIVE PROTEIN
2iP	6- $\gamma,\gamma$ -dimetilalilaminopurin
iRNK	Informaciona ribonukleinska kiselina
KAO	Oksidaza <i>ent</i> -kaurenoične kiseline
KD	Kratak dan (8h svetlosti)
KIN, kinetin	6-furfurilaminopurin
KO	<i>ent</i> -kauren oksidaza
KS	sintaza <i>ent</i> -kaurena
L1L	eng. LEAFY COTYLEDON-LIKE
LEC	eng. LEAFY COTYLEDON
LRR-RLK	eng. LEUCINE-RICH REPEAT RECEPTOR-LIKE KINASE
MES	2-(N-morfolino) etansulfonska kiselina
miRNK	Mikro ribonukleinska kiselina
NAA	$\alpha$ -naftil-sirćetna kiselina
pCPA	<i>para</i> -hlorfenoksisirćetna kiselina
PHYA	Fitohrom A



PHYB	Fitohrom B
PHYD	Fitohrom D
PIF	eng. PHITOCHROME INTERACTING FACTOR
PIN	eng. PIN-FORMED
PKL	eng. PICKLE
PPFD	Gustina fluksa fotona (eng. Photosynthetic Photon Flux Density)
PVP	Polivinilpirolidon
QTL	eng. Quantitative Trait Loci
RAM	Apikalni meristem korena (eng. Root Apical Meristem)
PIL5	eng. PHYTOCHROME-INTERACTING PROTEIN 5
RIP	Ribozom inaktivirajući proteini
RNK	Ribonukleinska kiselina
ROS	Reaktivne kiseonične vrste (eng. Reactive Oxygen Species)
RPK1	eng. RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE1
rRNK	Ribozomalna ribonukleinska kiselina
SAM	Apikalni meristem izdanka (eng. Shoot Apical Meristem)
SERF1	eng. SOMATIC EMBRYO RELATED FACTOR 1
SERK	eng. SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE
SLY1	eng. SLEEPY1
SK1	eng. STRESS KINASE 1
SPY	eng. SPINDLY
STM	eng. SHOOTMERISTEMLESS
SUR2	eng. SUPERROOT 2
TAA1	eng. TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE
TCL	Tankoslojni ćelijski preseci (eng. Thin Cell Layers)
w/v	Težina po zapremini (eng. weight/volumen)
WUS	eng. WUSCHEL
YUC	eng. YUCCA FLAVIN MONOOXIGENASE
ZEA, zeatin	6-(4-hidroksi-3-metil-but-trans-2-enilamino) purin
ZLL	eng. ZWILL

## 1. UVOD

Biotehnologija biljaka integriše dve velike oblasti: kulturu biljnih ćelija, tkiva i organa i genetičko inženjerstvo (Vasil, 2008). Poslednjih nekoliko decenija ova oblast je doživela izuzetnu ekspanziju, razvivši se od naučnog fenomena u tehnologiju sa širokom praktičnom primenom. Sve ovo je bilo moguće zahvaljujući snažnom napretku metoda za indukciju morfogeneze *in vitro*, koje su omogućile regeneraciju celog biljnog organizma iz jedne ćelije (Vasil, 2008).

### 1.1. Morfogeneza *in vitro*

Totipotentnost je sposobnost biljne ćelije da se dediferencira, deli i regeneriše organe, embrione ili ceo biljni organizam. Ova osobina je svojstvena samo biljnim ćelijama, a uočio ju je Haberlandt 1902. godine (Haberlandt, 1902). Koncept totipotentnosti se najpre odnosio na sve ćelije trajnih tkiva, osim onih visoko specijalizovanih. Međutim, poslednjih godina je pokazano da je totipotentnost ograničena na specifične tipove ćelija, kao što su ćelije zatvaračice stoma, bazalna ćelija trihoma i ćelije pericikla korena (Duclercq *et al.*, 2011). Na totipotentnosti biljne ćelije se zasniva većina puteva regeneracije *in vitro*.

Morfogeneza *in vitro* predstavlja regeneraciju organa ili celog biljnog organizma iz organa majke-biljke. U zavisnosti od tipa eksplantata i načina na koji se regeneranti formiraju razlikuju se: mikropropagacija, organogeneza, somatska embriogeneza i somatska hibridizacija. Mehanizam totipotentnosti, kao ni to kojim će putem regeneracija krenuti, još nije razjašnjen (Ji *et al.*, 2011.), mada se kod nekih biljnih vrsta morfogeneza može usmeravati ka organogenezi ili somatskoj embriogenezi jednostavnom manipulacijom sadržaja šećera i biljnih regulatora rastjenja (BRR) u medijumu (Charrière & Hahne, 1998). Osim toga, neretko se procesi organogeneze pupoljaka i somatske embriogeneze dešavaju paralelno u istom eksplantatu (Zdravković-Korać & Nešković, 1999).

#### 1.1.1. Mikropropagacija

Mikropropagacija u širem smislu reči podrazumeva svaki način razmnožavanja biljaka *in vitro*. Ipak, termin mikropropagacija se najčešće ograničava na razmnožavanje

vrhova apikalnih i aksilarnih pupoljaka. Kao eksplantat koristi se apikalni meristem sa bar dve najmlađe primordije lista, jer bez njih vegetaciona kupa ne može da se razvije, već daje samo nediferencirano kalusno tkivo. Ovim postupkom pojava somaklonalnog variranja je svedena na minimum, jer se razmnožavaju već formirani meristemi, koji su genetički relativno stabilni. Mikropropagacija omogućava umnožavanje genetički identičnih jedinki i koristi se za propagaciju elitnih genotipova. Murashige (1974) je prvi definisao tri koraka kojima se najčešće sprovodi mikropropagacija, a Debergh & Maene (1981) su dodali i četvrti: uspostavljanje aseptične kulture, multiplikacija, ožiljavanje i priprema za aklimatizaciju i aklimatizacija biljaka.

### 1.1.2. Organogeneza

Za razliku od mikropagacije, kojom se podstiče razviće prethodno formiranih primordija pupoljaka, pod organogenezom se podzumeva *de novo* obrazovanje pupoljaka (kaulogeneza) i korenova (rizogeneza) iz nemeristemskih tkiva. Kada se regenerisani pupoljci formiraju, oni se mogu dalje razmnožavati na isti način kao i apikalni i aksilarni pupoljci. Organogeneza po načinu postanka može biti direktna ili indirektna. Do direktne regeneracije dolazi kad eksplantat sadrži predeterminisane ćelije, koje imaju sposobnost da se dele i formiraju meristeme odmah po ulasku u ćelijski ciklus. Kad nema predeterminisanih ćelija, ćelije eksplantata se dediferenciraju kroz ćelijske deobe, pre nego što steknu sposobnost formiranja meristema. Meristemi pupoljka se najčešće formiraju na površini kalusa, a meristemi korenova od ćelija koje leže dublje u kalusu. Začetak pupoljka u kalusu indukuje na svojoj osnovi prokambijalnu vrpcu, koja se može povezati sa vaskularnim elementima u kalusu. Po ovoj anatomskoj karakteristici regenerisani pupoljci se razlikuju od somatskih embriona.

Još su Skoog & Miller (1957) uočili da odnos auksina i citokinina određuje put organogeneze i razvića biljnih ćelija. Višak auksina u medijumu indukuje rizogenezu, a višak citokinina kaulogenezu, dok u približnim koncentracijama izazivaju pojavu kalusnog tkiva (kalogeneza). Kaulogeneza se odvija u tri faze: 1) dediferencijacija ili sticanje kompetencije za regeneraciju, 2) indukcija ili determinacija ćelija za formiranje meristema i 3) morfogeneza organa, koja se dešava i bez prisustva BRR (Christianson & Warnick,

1983). Poslednjih godina preovladava stav da je totipotencija ograničena na specifične tipove ćelija, od kojih su najbolje proučene ćelije pericikla korena arabidopsisa (Duclercq *et al.*, 2011). Pokazano je da su ćelije pericikla blisko postavljene ksilemu pluripotentne, jer mogu da regenerišu meristeme korena i pupoljaka (Verdeil *et al.*, 2007; Atta *et al.*, 2009; Sugimoto *et al.*, 2010). Tokom kultivacije na medijumu bogatom auksinom, ćelije pericikla korena formiraju tvorevine nalik kalusu, koje nisu pravi kalusi, već imaju mnoge karakteristike meristema lateralnih korenova (Atta *et al.*, 2009). Sugimoto *et al.* (2010) smatraju da je ektopična aktivacija programa razvića lateralnih korenova opšti mehanizam za formiranje kalusa iz različitih biljnih organa, jer kaluse nije bilo moguće indukovati iz bilo kog biljnog organa mutanata koji su izgubili sposobnost formiranja lateralnih korenova. Osim toga, primordije lateralnih korenova ne zahtevaju preinkubaciju na medijumu bogatom auksinom, već imaju sposobnost kaulogeneze na medijumu bogatom citokininom (Atta *et al.*, 2009). Na osnovu ovih zapažanja se smatra da u eksplantatima postoje predeterminisane ćelije koje nastaju od meristemoida i nalaze se na specifičnom stadijumu kompetencije, pa se mogu deliti i formirati kalus i *de novo* pupoljke.

Ćelije u indukovanom stanju, koje imaju kompetenciju za organogenezu, su relativno nediferencirane u odnosu na neindukovane ćelije nekompetentne za organogenezu. Međutim, proces formiranja kalusa ne predstavlja reprogramiranje do bazalnog ili embrionalnog nediferenciranog stanja, kako se ranije smatralo (Atta *et al.*, 2009; Sugimoto *et al.*, 2010).

Istraživanja procesa kaulogeneze ukazuju da se najznačajniji događaji u regulaciji ovog procesa dešavaju na ranim stupnjevima i podrazumevaju kombinovan uticaj transdukcije signala, koju pokreću BRR, i kontrole transkripcije (Atta *et al.*, 2009; Sugimoto *et al.*, 2010). Interakcija (*eng.* cross-talk) između auksina i citokinina određuje *de novo* inicijaciju meristemskih ili "stem" ćelija. Preinkubacija eksplantata na medijumu bogatom auksinom indukuje kompetenciju ćelija, za koju je neophodno uspostavljanje gradijenta auksina u kalusu (Gordon *et al.*, 2007; Pernisová *et al.*, 2009). Prostorno-vremenski gradijent auksina, uspostavljen njegovom koordinisanom biosintezom i polarnim transportom, omogućava odgovor na citokinine u sledećoj fazi *de novo* kaulogeneze (Cheng *et al.*, 2013). U sledećoj fazi, na medijumu bogatom citokininom,

dolazi do formiranja identiteta organa i do morfogeneze apeksa izdanka (*eng.* Shoot Apical Meristem - SAM). Interakcija auksina i citokinina pokreće regulatornu mrežu transdukcije signala i aktivnost transkripcionih faktora, koja kontroliše uspostavljanje i održavanje SAM.

Poređenjem ekspresije gena u fragmentima korenova arabidopsisa tokom rane faze kalogeneze, kaulogeneze, rizogeneze i prolongirane kalogeneze uočeno je značajno reprogramiranje ekspresije gena (Che *et al.*, 2006). Tokom rane faze indukcije kalusa detektovana je povećana ekspresija gena uključenih u remodelovanje hromatina i transkripcionih faktora, dok su se pri prolongiranoj kalogenezi dominantno ekspimirali geni koji odgovaraju na stres. Tokom rane kaulogeneze, pre pojave primordija pupoljaka, detektovana je povećana ekspresija gena koji odgovaraju na osmotski stres, gena za metabolizam giberelina i transkripcione faktore. Uočena je i povećana ekspresija gena čiji su proizvodi uključeni u fotosintezu, pošto u ovoj fazi pupoljci počinju da zelene. Tokom rane rizogeneze su se ekspimirali geni specifični za razviće korenova, povezani sa formiranjem ćelijskog zida i razvićem provodnih elemenata.

I pored velikog napretka u razumevanju molekularnih mehanizama indukcije kaulogeneze, mnogi aspekti ovog procesa, posebno rekalcitrantnost prema regeneraciji, još uvek nisu razjašnjeni (Motte *et al.*, 2014). Nažalost, veliki broj biljnih vrsta odstupa od gore opisanog obrasca indukcije organogeneze, zbog čega se procedure za regeneraciju i dalje emirijski određuju.

### **1.1.3. Somatska embriogeneza**

Somatska embriogeneza je proces diferenciranja somatskih ćelija u embrione, kroz seriju karakterističnih morfoloških stadijuma: globularni, srce, torpedo i kotiledonarni, slično zigotskoj embriogenezi (Zimmerman, 1993; Schmidt *et al.*, 1997; Von Arnold *et al.*, 2002). Ova pojava je izuzetno retka u prirodi. Zapažena je na marginama listova *Bryophyllum sp.* (Yarbrough, 1932) i *Malaxis sp.* (Taylor, 1967), a može nastati i apomiksizom iz neoplodene jajne ćelije ili iz materinskog tkiva (Koltunow & Grossniklaus, 2003).

### 1.1.3.1. Sličnosti i razlike između zigotske i somatske embriogeneze

Postoje velike sličnosti između razvića zigotskih i somatskih embriona (SE), kako morfološki tako i biohemijski (Schmidt *et al.*, 1997; Cui & Dai, 2000; Chen & Lai, 2001). Sličnost se ogleda u tome, što se jedna ćelija (zigot ili somatska ćelija) razvija u embrion koji predstavlja novu individuu. Osim toga, već na inicijalnom stupnju u zigotu i embriogenoj somatskoj ćeliji se uspostavlja polarnost ćelije (Dodeman *et al.*, 1997) i u oba tipa embriona se eksprimiraju određeni specifični geni (Schmidt *et al.*, 1997).

Razlike između somatskih i zigotskih embriona se javljaju usled različitog okruženja u kojem se embrioni razvijaju (Dodeman *et al.*, 1997). Osim toga, zigot je prirodno embriogena ćelija, dok je kod somatskih ćelija neophodno indukovati kompetenciju za somatsku embriogenezu (Dodeman *et al.*, 1997). Zigot se kod većine biljnih vrsta deli nejednakom deobom, a pozicija novonastalih ćelija određuje njihovo dalje razviće i funkciju u embrionu. Apikalno-bazalna osovina zigota se formira već na dvoćelijskom stupnju razvića zahvaljujući transportu auksina iz bazalne u apikalnu ćeliju (Friml *et al.*, 2003). Gradijent auksina kod arabidopsisa uspostavlja transporter auksina "PINFORMED" PIN7, koji je lociran apikalno u plazma membrani bazalne ćelije. Apikalna ćelija daje embrion, a bazalna suspensor (Liu *et al.*, 1993). Suspensor je značajan za pravilno formiranje embriona, uključujući i uspostavljanje njegove polarnosti (Ueda *et al.*, 2011), pozicioniranje embriona unutar semena i dopremanje hranljivih materija i hormona (Cionini *et al.*, 1976). Kasnije tokom razvića PIN7 zamenjuje PIN1, koji obrazuje gradijent auksina na suprotnom polu, potreban za specifikaciju bazalnog pola korena (Friml *et al.*, 2003). Za razliku od zigota, pozicija ravni deobe somatskih embriogenih ćelija je vrlo varijabilna (Mordhorst *et al.*, 1997), a suspensor se može ali i ne mora razviti (Yeung *et al.*, 1996; Supena *et al.*, 2008; Soriano *et al.*, 2014). Međutim, somatski embrioni se normalno diferenciraju i kad se embriogena ćelija podeli jednakom deobom, a suspensor se ne formira (Soriano *et al.*, 2014).

Mada zigotski, somatski, haploidni i embrioni nastali apomiksisom nastaju iz različitih tkiva i bivaju aktivirani različitim stimulusima, mnogi istraživači smatraju da je isti signalni put prisutan kod sva tri procesa na najranijem stupnju njihove indukcije

(Mordhorst *et al.*, 1997; Lotan *et al.*, 1998; Koltunow & Grossniklaus, 2003), što je u skladu sa najnovijim saznanjima o molekularnim mehanizmima koji leže u osnovi ovih procesa, o čemu će kasnije biti više reči.

Pošto najčešće nastaju ukrštenim oplodnjem, zigotski embrioni začeti na istoj majci-biljci se genetički međusobno razlikuju, kao i u odnosu na majku-biljku. Za razliku od njih, somatski embrioni su genetički identični biljnom organizmu iz koga su indukovani. Zbog toga je somatska embriogeneza superioran vid klonalnog propagiranja elitnih genotipova.

### 1.1.3.2. Indukcija i razviće somatskih embriona

Somatsku embriogenezu *in vitro* su prvi put opisali Reinert (1958) i Steward *et al.* (1958) kod šargarepe. Od tada je somatska embriogeneza indukovana i opisana kod velikog broja biljnih vrsta (Von Arnold, 2002).

Somatska embriogeneza se odvija kroz dve faze: indukciju i ekspresiju. Tokom faze indukcije, somatske ćelije stiču kompetenciju za somatsku embriogenezu i proliferiraju, dok se tokom faze ekspresije embriogene ćelije diferenciraju u somatske embrione (Jimenez, 2001). Smatra se da su ove dve faze međusobno nezavisne i da na njih utiču različiti faktori (Jimenez, 2001). Kompetentne ćelije su prelazan oblik od somatskog ka embriogenom stanju, koje još uvek zahteva egzogene stimuluse (Toonen *et al.*, 1994), dok embriogene ćelije imaju sposobnost regeneracije embriona bez egzogenih stimulusa (Komamine *et al.*, 1992). Embrion može nastati iz jedne ili više ćelija (Williams & Maheswaran, 1986).

Somatska embriogeneza može biti direktna ili indirektna. Tokom direktne somatske embriogeneze, embrioni regenerišu direktno iz biljnih organa, protoplasta ili mikrospora (Williams & Maheswaran, 1986). Smatra se da do direktne somatske embriogeneze dolazi kad su u eksplantatu već prisutne proembriogene kompetentne ćelije, koje zahtevaju samo neznatno reprogramiranje ekspresije gena (Willemsen & Scheres, 2004). Tokom indirektno somatske embriogeneze najpre dolazi do formiranja kalusa na eksplantatima, a zatim iz kalusa regenerišu somatski embrioni. Tokom ovog procesa dolazi do značajnijih epigenetičkih promena i ćelije stiču kompetenciju za somatsku embriogenezu tek posle više

ciklusa ćelijskih deoba (Willemsen & Scheres, 2004). Međutim, neka istraživanja su pokazala da ćelijska deoba nije esencijalna za reprogramiranje na embriogeni put razvića, npr. kada je proces somatske embriogeneze indukovano toplotnim stresom (Kikuchi *et al.*, 2013).

U kalusu se među krupnim, vakuoliziranim ćelijama, zapažaju embriogene ćelije koje su sitne, imaju krupno jedro i citoplazmu, a često su odvojene debljim zidom bez plazmodezmi (Fransz & Schel, 1991; Dudits *et al.*, 1991; Somleva *et al.*, 2000; Pasternak *et al.*, 2002). Takve ćelije su označene kao kompetentne za somatsku embriogenezu. Međutim, mada su ovo najčešće morfološke osobine ćelija kompetentnih za somatsku embriogenezu, vizuelizacijom *in vivo* je pokazano da ove ćelije mogu imati različit oblik, pa se ne mogu identifikovati samo na osnovu morfologije (Toonen *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1997).

Posle nekoliko deoba kompetentnih ćelija, formira se globula od većeg broja ćelija ekvivalentna globularnom embrionu ili se formira proembrionalna masa na čijem se obodu nalazi više malih globularnih embriona. Kako je suspenzor kod somatskih embriona veoma redukovan, pretpostavlja se da proembrionalna masa može preuzeti njegovu ulogu. Somatski embrioni se od regenerisanih pupoljaka razlikuju po rano uspostavljenoj bipolarnosti i po tome što koren ne obrazuje vaskularnu vezu sa kalusnim ili materinskim tkivom. U stadijumu torpeda somatski embrioni nekih biljnih vrsta su sposobni da klijaju pod povoljnim uslovima, za razliku od zigotskih koji u ovom stadijumu zahtevaju obavezan prolaz kroz fazu sazrevanja i dormancije (Dodeman *et al.*, 1997).

Česta je pojava da se na primarnom embrionu razvija veći broj sekundarnih embriona (Thomas *et al.*, 1976.). Ta pojava je ciklična i naziva se sekundarna, rekurentna ili repetativna somatska embriogeneza. Sekundarna somatska embriogeneza omogućava umnožavanje somatskih embriona i amplifikaciju procesa somatske embriogeneze. Somatski embrioni na najmlađim stupnjevima razvića najčešće imaju najveći potencijal za sekundarnu somatsku embriogenezu (Gaj, 2004; Čalić *et al.*, 2005; Nair & Gupta, 2006; Zdravković-Korać *et al.*, 2008).



### 1.1.3.3. Mehanizam indukcije somatske embriogeneze

Većina, ako ne i svi tretmani koji indukuju somatsku embriogenezu utiču na balans auksina u ćeliji (Fehér *et al.*, 2003). Smatra se da egzogeni auksini utiču na stvaranje gradijenta koncentracije auksina u eksplantatima, i da je upravo to jedan od ključnih signala za sticanje embriogene kompetencije (Thomas *et al.*, 2002; Jimenez *et al.*, 2005). Asimetrična distribucija auksina, pre nego njegov apsolutni nivo, pokreću deobu embriogene ćelije i inicijaciju somatske embriogeneze (Chiappetta *et al.*, 2009). Ponovno uspostavljanje polarnosti ćelija je jedan od važnijih događaja koji prethode somatskoj embriogenezi. Jedan od mehanizama za kontrolu uspostavljanja polarnosti je kretanje auksina u tkivu koje okružuje ćeliju (Williams & Maheswaran, 1986). Polarizacija transportera auksina određuje formiranje gradijenta i smer protoka auksina (Benková *et al.* 2003; Petrášek & Friml 2009). Transport auksina je pod kontrolom influks simportera "AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1" (AUX1/LAX) i efluks transportera PIN i "ABCB/P-GLYPROTEIN" (PGP) (Petrášek & Friml 2009). Upravo ovaj transport zavisan od diferencijalne distribucije auksina je kritičan za razviće somatskih embriona. Važnost asimetrične distribucije auksina podržava i *in vivo* vizuelizacija pPIN1::PIN1-GFP tokom *de novo* morfogeneze somatskih embriona (Zhao, 2008). Međutim, histohemijskom imunolokalizacijom je pokazano da akumulacija indol-3-sirćetne kiseline (IAA) nije ograničena samo na ćelije začetnice somatskih embriona (Kurcyńska *et al.*, 2007; Chiappetta *et al.*, 2009). Zato se veruje da je puls auksina potreban uslov za pokretanje ćelijske deobe, ali da je potreban i dodatni, još uvek nepoznat, signal da pokrene taj proces samo u nekim ćelijama. Još uvek nije jasno da li je lokalizovana akumulacija auksina posledica njegove *de novo* sinteze ili redistribucije polarnim transportom (Chiappetta *et al.*, 2009), kao ni to na koji način embriogene ćelije stiču hormonsku autonomnost (Fehér, 2008).

Prvi događaj u formiranju primordija je periklina deoba embriogene ćelije začetnice (Benková *et al.*, 2003). Na pozicioniranje ravni deobe takođe utiče polarni transport auksina (Dhonukshe *et al.*, 2005). Ranije se smatralo da je nejednaka ćelijska deoba ključan faktor za razviće somatskih embriona, kao kod zigotskih embriona nekih biljnih vrsta (Komamine *et al.*, 1992). Međutim, novija istraživanja su pokazala da su embriogene ćelije

mikrospora osetljive na auksin i sposobne da razviju osovinu embriona i bez egzogenog auksina, što ukazuje da sintetišu auksin *de novo* ili ga oslobađaju iz konjugovanih formi (Soriano *et al.*, 2014). Na uspostavljanje osovine embriona posle prve deobe embriogene ćelije mogu uticati i eksterni faktori, npr. mehanički (Nakayama *et al.*, 2012).

Posle procesa indukcije, somatski embrioni se dalje razvijaju bez prisustva auksina (Dudits *et al.*, 1991), a njegovo konstantno prisustvo u medijumu najčešće inhibira razviće somatskih embriona i zaustavlja embriogeno tkivo na nivou proembriogene mase ćelija (de Vries *et al.*, 1988).

#### **1.1.3.4. Faktori koji utiču na somatsku embriogenezu**

Veliki broj publikacija ukazuje da je genetički faktor ključan za kompetenciju za somatsku embriogenezu i da se ova osobina nasleđuje. Međutim, sve je veći broj biljnih vrsta kod kojih je indukovana somatska embriogeneza, uključujući i one za koje je dugo smatrano da nemaju ovu sposobnost. Zbog toga preovladava stav da je sposobnost biljnih tkiva da regenerišu embrione relativno česta pojava, ali da su uslovi pod kojima ova osobina dolazi do izražaja vrlo varijabilni i da ih je teško definisati za određene biljne vrste (Von Arnold *et al.*, 2002; Fehér, 2008). Složena interakcija genetičkih i fizioloških faktora određuje da li će doći do ekspresije embriogenog potencijala biljne ćelije i objašnjava zašto samo određeni genotipovi i određeni tip ćelija ima embriogeni kapacitet (Fehér, 2008).

Preusmeravanje na embriogeni put razvića je plastičan i reverzibilan proces, jer se put razvića ćelija može preusmeriti manipulacijom uslovima kultivisanja (Pasternak *et al.*, 2002). Somatsku embriogenezu mogu indukovati vrlo različiti stimulusi, ali bez obzira na prirodu inducera, odgovor biljnih ćelija je isti (Pasternak *et al.*, 2002).

#### Genotip

Genotip je ključan faktor u indukciji somatske embriogeneze mnogih biljnih vrsta, a efikasnost regeneracije varira čak i u okviru istog varijeteta (Ji *et al.*, 2011). Uticaj genotipa na indukciju somatske embriogeneze pokazan je kod mnogih biljnih vrsta npr. *Phaseolus vulgaris* (Wang *et al.*, 2005), *Cyclamen persicum* (Bian *et al.*, 2007), *Linum usitatissimum* (Behar *et al.*, 2011), pirinča (Huang *et al.*, 2002; Lee & Huang, 2013), *Miscanthus* sp.

(Glowacha *et al.*, 2010) i spanača (Komai *et al.*, 1996a; Knoll *et al.*, 1997; Ishizaki *et al.*, 2001).

Poznato je da superioran roditelj prenosi potomstvu gene za visok regenerativni potencijal (Marchionni-Basté *et al.*, 2007; Anami *et al.*, 2010). Kod nekih biljnih vrsta su mapirani lokusi (eng. Quantitative Trait Loci - QTL) povezani sa regenerativnim potencijalom (Bolibok *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2009; Hromada-Judycka *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012), a za ekonomski najznačajnije biljne vrste su razvijeni i molekularni markeri za detekciju jedinki sa visokim regenerativnim potencijalom (Bolibok & Rakoczy-Trojanowska, 2006; Jia *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2010; Priyono *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). Na osnovu klasičnih genetičkih studija, najpre je predloženo da dva komplementarna gena kontrolišu sposobnost za somatsku embriogenezu (Pueschel *et al.*, 2003; Moltrasio *et al.*, 2004), ali je kasnije uočeno da je veći broj lokusa na različitim hromozomima uključen u ovaj proces (Bolibok & Rakoczy-Trojanowska, 2006; Taguchi-Shiobara *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2009).

### Biljni regulatori rastenja

Uloga BRR u konverziji ćelije u embriogenu ili ćeliju koja će formirati meristemsko tkivo, nije do kraja objašnjena. Tome doprinose veoma različiti i često kontradiktorni rezultati postignuti kod različitih biljnih vrsta. Ipak, značaj BRR većina autora ističe kao ključan faktor za indukciju regeneracije (Barreto *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2010; Sun & Hong, 2010; Huang *et al.*, 2012). Osim toga, potrebno je usaglasiti delovanje egzogenih BRR sa sadržajem endogenih fitohormona i osetljivosti tkiva prema njima (Jiménez, 2005). Pokazano je da su eksplantati sa višim nivoom endogenih auksina pogodniji za indukciju somatske embriogeneze (Jiménez, 2005), a neki čak ne zahtevaju egzogeni auksin (Ikeda-Iwai *et al.*, 2003).

Samo kod malobrojnih biljnih vrsta regeneracija putem somatske embriogeneze je postignuta spontano, bez prisustva BRR u medijumu (Gaj, 2004). Smatra se da su auksini i citokinini ključni za determinaciju embriogenog odgovora, najverovatnije zbog njihove uloge u regulaciji ćelijskog ciklusa i deobi ćelija (Zambryski & Crawford, 2000; Franis & Sorrell, 2001; Fehér *et al.*, 2003; Gaj, 2004; Jiménez, 2005). Gaj (2004) ističe da su u čak

80% protokola za indukciju somatske embriogeneze kod raznih biljnih vrsta korišćeni samo auksini ili kombinacija auksina i citokinina. Od auksina je najzastupljenija (u više od 65% protokola) 2,4-dihlorfenoksi sirćetna kiselina (2,4-D) (Karami *et al.*, 2009), dok su  $\alpha$ -naftil-sirćetna kiselina (NAA) i indol-3-sirćetna kiselina (IAA) ređe korišćene, npr. kod *Citrus reticulata* (Cui & Dai, 2000) i rukole (Zhang *et al.*, 2005).

Najzastupljeniji citokinini u protokolima za regeneraciju somatskih embriona su N<sup>6</sup>-benzilaminopurin (BAP), 6-furfurilaminopurin (kinetin, KIN), zeatin 6-(4-hidroksi-3-metil-but-*trans*-2-enilaminopurin) i tidiazuron (TDZ) (Raemakers *et al.*, 1995). BAP se najčešće koristi za indukciju regeneracije *in vitro* zbog visoke efikasnosti kod velikog broja biljnih vrsta i ekonomičnosti (Van Staden *et al.*, 2008). Međutim, kod velikog broja biljnih vrsta BAP izaziva nepoželjne fiziološke i morfološke promene, posebno hiperhidratisanost (Bairu *et al.*, 2007), pa se u poslednje vreme sve češće koriste topolini, hidroksilovani analozi BAP, koji su se pokazali kao jednako efikasni i ekonomični, ali sa manje neželjenih efekata (Aremu *et al.*, 2012). Derivati feniluree, posebno TDZ, imaju snažno citokininsko dejstvo i uspešno se koriste za indukciju regeneracije tzv. rekalcitrantnih biljnih vrsta, odnosno vrsta koje vrlo teško regenerišu *in vitro* (Murthy *et al.*, 1998).

Za indukciju regeneracije samo retko su korišćeni apscisinska kiselina (ABA), giberelini i etilen. Dodavanje ABA u medijum je stimulisalo pojavu somatskih embriona kod *Dactylus glomerata* (Bell *et al.*, 1993) i šargarepe (Nishiwaki *et al.*, 2000), a tretiranje tkiva fluridonom, inhibitorom biosinteze ABA, je značajno smanjilo embriogeni kapacitet tkiva šargarepe (Kikuchi *et al.*, 2006). Prisustvo giberelina (najčešće giberelne kiseline - GA<sub>3</sub>) je stimulisalo regeneraciju jabuke, kruške i višnje, dok je regeneracija citrusa bila inhibirana ovim regulatorom rastenja (Chen & Lai, 2001). Etilen najčešće ima inhibitorno dejstvo (Nomura & Komamine, 1995; Thorpe, 2000).

### Svetlost

U uslovima *in vitro*, svetlost kontroliše mnoge fiziološke procese i utiče na rasteenje, anatomiju i morfogenezu biljke (Morini *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2007; Mengxi *et al.*, 2011). Kod nekih biljnih vrsta, regeneracija *in vitro* je potpuno inhibirana u mraku, kao kod

paradajza (Lercari *et al.*, 1999) i *Petunia hybrida* (Reuveni & Evenor, 2007). Kod drugih biljnih vrsta, regeneracija nije potpuno inhibirana, ali je njena efikasnost značajno manja nego na kontinuiranoj svetlosti, a regeneranti često imaju abnormalno razviće (Rinaldi, 1999; Hunter & Burritt, 2004). Sa druge strane, kod nekih biljnih vrsta mrak je kao predtretman neophodan za uspešnu regeneraciju (Pédua *et al.*, 1998.; Compton, 1999.; Kanwar *et al.*, 2010). Kontinuirano osvetljenje se pokazalo kao najefikasnije u indukciji regeneracije iz meristemskog tkiva *Hyernia hystrix* (Amoo *et al.*, 2009), dok su se kod drugih biljnih vrsta uslovi dugog dana (16h svetlosti) pokazali kao optimalni (Rinaldi, 1999; Wang *et al.*, 2008; Koetle *et al.*, 2010).

Za somatsku embriogenezu, ali i ostale vidove morfogeneze *in vitro*, je pored trajanja svetlosnog perioda veoma važan intezitet, odnosno gustina fluksa fotona (eng. Photosynthetic Photon Flux Density - PPF) i kvalitet svetlosti. Neke biljne vrste zahtevaju nizak PPF za normalano rastenje i regeneraciju *in vitro*, kao *Withania somnifera*, sa optimumom na 30  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$  (Lee *et al.*, 2007), dok se kod banane nabolji efekat postiže na PPF od čak 570  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$  (Kodym & Zapata-Arias, 1999). Veliki broj studija ističu ulogu fotoreceptora fitohroma i kriptohroma u kontroli morfogenetskih procesa (D'Onofrio *et al.*, 1998; Morini *et al.*, 2000; Burritt & Leung, 2003). Istraživanja su pokazala da je crvena svetlost kod nekih biljnih vrsta neophodna za inicijaciju meristema, dok plava svetlost podstiče razviće i diferencijaciju (Burritt & Leung, 2003; Mengxi *et al.*, 2011). Povećana efikasnost somatske embriogeneze pod uticajem crvene svetlosti je pokazana kod dunje (D'Onofrio *et al.*, 1998), šargarepe (Michler & Lineberger, 1987), nekoliko vrsta borova (Merkle *et al.*, 2005) i *Rosa sinensis* (Chen *et al.*, 2014).

### Sredinski stres

Stres ima značajnu ulogu u indukciji somatske embriogeneze. Vrlo različiti faktori, kao nedostatak hranljivih materija, toplotni stres, osmotski stres ili joni teških metala mogu biti induktivni kad se primene na subletalnom nivou (Touraev *et al.*, 1996; Stasolla & Yeung, 2003; Langhansova *et al.*, 2004; Soriano *et al.*, 2014). Jedan od najilustrativnijih primera je somatska embriogeneza šargarepe, koja može biti indukovana višestrukim faktorima stresa, jonima teških metala ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Co}^{2+}$ ), osmotskim ili toplotnim stresom u odsustvu

BRR (Kamada *et al.*, 1989, 1993, 1994). BRR se takođe mogu razmatrati kao faktori stresa kad se primenjuju u visokoj koncentraciji. Dobra ilustracija za to je i činjenica da je za indukciju somatske embriogeneze potrebna hiljadu puta veća koncentracija IAA od endogene (Kamada & Harada, 1979). Sintetički auksin 2,4-D indukuje somatsku embriogenezu iz protoplasta lucerke kad se primeni u koncentraciji 10  $\mu\text{M}$ , dok 1  $\mu\text{M}$  2,4-D nije dovoljan da indukuje somatsku embriogenezu (Pasternak *et al.*, 2002). Međutim, ako se kulture protoplasta gajene pod neinduktivnim uslovima (1  $\mu\text{M}$  2,4-D) dodatno izlože i oksidativnom stresu (1 mM Fe-EDTA), dolazi do indukcije somatske embriogeneze. Pod induktivnim uslovima je detektovano povećanje askorbat peroksidaze već posle 1 dana, što potvrđuje hipotezu da je stres inducer somatske embriogeneze (Pasternak *et al.*, 2002). Korelacija između somatske embriogeneze i povećanja aktivnosti enzima antioksidativnog sistema je uočena kod mnogih biljnih vrsta, npr. kod gladiole i šafrana (Dutta Gupta & Datta, 2003/4; Blazquez *et al.*, 2009). Reaktivni molekuli kiseonika (eng. Reactive Oxygen Species - ROS), prisutni u niskoj koncentraciji, imaju pozitivnu ulogu na mnoge fiziološke procese u biljci, uključujući i sticanje kompetencije za embriogenezu (Žur *et al.*, 2014). Međutim, snažniji oksidativni stres može da izazove potpuni gubitak totipotencije (Papadakis *et al.*, 2001).

Tokom razvika SE je uočena značajna indukcija ekspresije i nekih drugih gena koji odgovaraju na stres, kao što su geni za kinaze, transkripcione faktore i geni uključeni u biosintezu i signalizaciju ABA i jasmonske kiseline (Thibaud-Nissen *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2014). U skladu s tim, nivo endogene ABA takođe raste u ćelijama tokom stresa. Međutim, ABA primenjena na biljno tkivo u koncentraciji približnoj endogenoj nije dovoljna za indukciju somatske embriogeneze u nestresnim uslovima (Kikuchi *et al.*, 2006).

Kaloza, koja se deponuje kao odgovor biljnog tkiva na stresne uslove, izaziva gubitak komunikacije između ćelija, usled čega dolazi do dediferencijacije, međusobnog razdvajanja proembriogenih ćelija i razvika embriona (You *et al.*, 2006).

Na osnovu mnogih posmatranja, pretpostavljeno je da je somatska embriogenezna reakcija biljaka na stresne uslove. Smatra se da uslovi kultivisanja *in vitro* predstavljaju stres za biljne ćelije (Desjardins *et al.*, 2009).

### pH medijuma

Rana istraživanja su pokazala da pH medijuma utiče na indukciju i razviće SE (Smith & Krikorian, 1990a, b), na osnovu čega je pretpostavljeno da BRR modifikuju polarnost ćelije utičući na gradijent pH ili električno polje oko ćelije (Brawley *et al.*, 1984; Smith & Krikorian, 1990a). U ćelijama lucerke aktivacija ćelijskih deoba je bila u korelaciji sa povećanjem pH u njihovoj citoplazmi i vakuoli. Uključenje pufera 2-(*N*-morfolino) etansulfonske kiseline (MES) u medijum koji je bio induktivan za sticanje embriogene kompetencije (uz dodatak 10  $\mu$ M 2,4-D), je uzrokovalo gubitak embriogenog kapaciteta, što ukazuje na važnost eksternog pH za gradijent protona na plazma membrani za ćelijsku deobu (Pasternak *et al.*, 2002).

### Izvor azota

Neorganski azot se najčešće dodaje u medijum u obliku nitrata i amonijuma. Za efikasnu indukciju i razviće somatskih embriona, za svaku biljnu vrstu treba optimizirati ne samo ukupnu količinu azota u medijumu, već i odnos amonijuma i nitrata (Luciani *et al.*, 2001; Greer *et al.*, 2009). Amonijum ( $\text{NH}_4^+$ ) kao jedini izvor azota negativno utiče na rastenje i morfogenezu, usled toksičnosti prema biljnom tkivu, acidifikacije medijuma i uticaja na metabolizam ugljenih hidrata i minerala u biljnom tkivu (Britto & Kronzucker, 2002). S druge strane, nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) je značajan ne samo kao izvor azota, već i kao signalni molekul (Stitt *et al.*, 2002; Takei *et al.*, 2002). U većini slučajeva, najveća efikasnost somatske embriogeneze se postiže kad su u medijumu prisutna oba oblika azota (Raina & Zapata, 1997). Kod bundeve je demonstrirana indukcija somatske embriogeneze u prisustvu amonijuma ( $\text{NH}_4^+$ ) kao jedinog izvora azota (Leljak-Levanić *et al.*, 2004a), koja je pripisana efektu stresa, za koga se ispostavilo da nije bio povezan sa promenom pH medijuma (Leljak-Levanić *et al.*, 2004b). Pod ovim uslovima, proliferacija ćelija je bila značajno redukovana, a proces somatske embriogeneze je bio zaustavljen na stadijumu proembriogene mase ćelija, sve dok u medijum nije bio dodat nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) ili glutamin (Mihaljević *et al.*, 2011). Ove supstance su indukovale pojavu globularnih somatskih embriona i njihovo dalje razviće. Autori su pokazali da je u ovom slučaju regeneracija somatskih embriona bila zaustavljena na nivou proembriogenih ćelija zbog nedostatka

azota, a ne zbog signalne funkcije nitrata. Treba imati na umu i da sadržaj mineralnog rastvora utiče na osetljivost eksplantata prema BRR (Ramage & Williams, 2002). Kod pirinča je uočeno da odnos amonijuma i nitrata utiče na osetljivost eksplantata prema 2,4-D (Grimes & Hodges, 1990). Za indukciju regeneracije različitih biljnih vrsta, najčešće se koristi MS mineralni rastvor (Murashige & Skoog, 1962), koji je bogat amonijumom i nitratom (Ji *et al.*, 2011).

Osim neorganskog, organski azot takođe utiče na efikasnost somatske embriogeneze. Organski azot se najčešće primenjuje u obliku amino kiselina (Gerdakaneh *et al.*, 2011). Na povećanje efikasnosti somatske embriogeneze kod različitih biljnih vrsta pozitivno su uticali: glutamin (Zouine & El Hadrami, 2007; Kim & Moon, 2007; Gerdakaneh *et al.*, 2011), alanin (Gerdakaneh *et al.*, 2011), arginin (Nieves *et al.*, 2008) i prolin (Hita *et al.*, 2003; Biswas *et al.*, 2007; Gerdakaneh *et al.*, 2011), mada se efekat prolina može tumačiti i kroz funkciju osmolita u prevazilaženju stresnih uslova (Nounjan *et al.*, 2012).

#### Izvor ugljenika

Kao osnovni izvor ugljenika u medijumu za gajenje biljaka u uslovima *in vitro* koriste se različiti šećeri. Šećeri su ne samo izvor ugljenika i energije, već utiču na osmotski potencijal medijuma i funkcionišu kao signalni molekuli (Lipavská & Konrádová, 2004). Mada su za indukciju regeneracije različitih biljnih vrsta korišćeni brojni šećeri: saharoza, glukoza, fruktoza, maltoza, laktoza, celobioza, manitol, sorbitol itd., najčešće je korišćena saharoza. Smatra se da saharoza reguliše metabolizam ugljenih hidrata i utiče na odnos saharoza/heksoza, za koji se pretpostavlja da je signal za sintezu skroba i rezervnih proteina, neophodnih za pravilno razviće i klijanje somatskih embriona (Iraqi & Tremblay, 2001a, b). U nekim studijama maltoza je bila superiorniji izvor ugljenika od saharoze za indukciju somatskih i androgenih embriona (Gutiérrez Pesce & Rugini, 2004; Javed *et al.*, 2007; Redha & Talaat, 2008). Maltoza hidrolizuje znatno sporije od saharoze, zbog čega je nivo heksoza nizak, što može biti signal za promenu programa razvića i pokretanje somatske embriogeneze (Blanc *et al.*, 2002). Kao što je već pomenuto, šećeri imaju i značajnu signalnu funkciju (Hanson & Smeekens, 2009), indukuju ekspresiju gena za



cikline (Kwon & Wang, 2011; Rosa *et al.*, 2013) i na taj način učestvuju u regulaciji proliferacije i razvića biljnih ćelija. Preferencija prema tipu šećera je specifična za svaku biljnu vrstu, kultivar ili liniju ćelija i može se menjati tokom indukcije i razvića embriona (Lipavská & Konrádová, 2004), pa za svaku biljnu vrstu treba empirijski odrediti optimalni tip i koncentraciju šećera.

### Prirodni ekstrakti

Hidrolizat kazeina, slad, homogenat banane i kokosovo melko pozitivno utiču na indukciju regeneracije kod nekih biljnih vrsta. Slad je bogat ugljenim hidratima, hidrolizat kazeina aminokiselinama, a kokosovo mleko citokinima, dok sadržaj homogenata banane nije definisan (Thorpe *et al.*, 2008). Međutim, ovi preparati se sve ređe koriste zbog varijabilnog sadržaja. Poznato je da hidrolizat kazeina, stimuliše pojavu somatskih embriona kod vinove loze, breskve, belog luka i celera (Robacher, 1993; Hita *et al.*, 2003; Kim & Moon, 2007; Bian *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2011). Slad pozitivno utiče na indukciju somatske embriogeneze iz tankoslojnih preseka (*eng.* Thin Cell Layers - TCL), multiplikaciju i klijanje somatskih embriona citrusa (Das *et al.*, 1995; Carimi *et al.*, 1998,1999). Kokosovo mleko indukuje somatsku embriogenezu kod papaje i manga, mada inhibira istu pojavu kod kruške i jabuke (Cui & Dai, 2000).

### Ostale supstance

U medijum se često dodaju antibiotici ili herbicidi u cilju selekcije genetički transformisanih ćelija. Zahvaljujući svom citotoksičnom efektu, oni često inhibiraju regeneraciju *in vitro*, mada ima i primera hormoneze, odnosno stimulacije regeneracije niskim dozama inače toksičnih supstanci (Garzon & Flores, 2013). Čak i u niskim koncentracijama kanamicin inhibira morfogenezu kod prosa (Eapan & George, 1990), jabuke (Yepes & Aldwinckle, 1994) i pinjola (Humara & Ordas, 1999). Suprotno tome, uočen je pozitivan efekat kanamicina (Burgos & Alburquerque, 2003), cefotaksima (Yepes & Aldwinckle, 1994) i timentina (Costa *et al.*, 2000; da Silva Mendes *et al.*, 2009) na indukciju morfogeneze *in vitro*. Pojava hormoneze je uočena u promociji regeneracije iz listova krompira niskom dozom (1 mg/l) higromicina (Park *et al.*, 1995), dok je za indukciju

regeneracije iz kalusa čaja (Aoshima, 2005) i nezrelih zigotskih embriona crnog luka (Eady & Lister, 1998) bila potrebna veća koncentracija higromicina (5-10 mg/l, odnosno 10-30 mg/l). Osteljivost prema higromicinu, sa aspekta morfogeneze, varira između kultivara (Park *et al.*, 1995), tkiva i organa (Eady & Lister, 1998; Meng *et al.*, 2007), kao i stadijuma razvića biljnog donor materijala (Zhang *et al.*, 2000; Zhang & Puonti-Kaerlas, 2000).

#### 1.1.3.5. Molekularni aspekti somatske embriogeneze

Epigenetičke promene do kojih dolazi tokom dediferenciranja somatskih ćelija i njihovog rediferenciranja u embriogene ćelije uključuju remodelovanje hromatina i modulaciju ekspresije gena (Santos & Fevereiro, 2002; Willmann *et al.*, 2011; Miguel & Marum, 2011; Neelakandan & Wang, 2012). Remodelovanje hromatina i euhromatinizacija ukidaju utišavanje gena za embriogeno razviće u vegetativnim ćelijama. Ovaj proces mogu indukovati različiti faktori, kao što je visoka doza auksina i subletalni stres, što objašnjava zašto veliki broj faktora izaziva isti odgovor (Fehér, 2008). Za remodelovanje hromatina je neophodna aktivnost odgovarajućih enzima koji vrše modifikaciju histona (Williams *et al.*, 2003; Grafi *et al.*, 2007), dok do modulacije ekspresije gena dolazi metilacijom regulatornih sekvenci i utišavanjem gena na transkripcionom i posttranskripcionom nivou posredstvom mikro ribonukleinskih kiselina (miRNK). Povećan nivo metilacije u prisustvu auksina je još davno detektovan tokom somatske embriogeneze šargarepe (LoSchiavo *et al.*, 1989), a potvrđen je i u kasnijim istraživanjima (Legrand *et al.*, 2007; He *et al.*, 2011; Nic-Can *et al.*, 2013). Osim toga, pokazano je da miRNK učestvuju u regulaciji somatske embriogeneze, jer je uočena specifična ekspresija miRNK na određenim stupnjevima somatske embriogeneze (Luo *et al.*, 2006; Nodine & Bartel, 2010; Wu *et al.*, 2011); npr. tokom somatske embriogeneze pamuka detektovana je specifična ekspresija 61 miRNK (Yang *et al.*, 2013).

Mada je kloniran veliki broj gena koji se specifično eksprimiraju tokom somatske embriogeneze, tačan mehanizam prelaska sa programa vegetativnog na program embrionalnog razvića još uvek nije poznat (Fehér, 2008; Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015).

Geni koji se smatraju najznačajnijim za indukciju somatske embriogeneze kodiraju transkripcione faktore ili enzime za remodelovanje hromatina. Iako su funkcije koje oni

vrše poznate, redosled njihove aktivacije i tačni ciljni geni na čiju ekspresiju utiču još uvek nisu sasvim poznati. "WUSCHEL" (WUS) promovira tranziciju iz neembriogenog u embriogeno stanje stimulacijom ekspresije "LEAFY COTYLEDON" (LEC) gena (Zheng *et al.*, 2014). LEC indukuju ekspresiju "YUCCA FLAVIN MONOOXIGENASE" (YUC) gena koji kodiraju enzime za biosintezu auksina (Stone *et al.*, 2008; Wójcikowska *et al.*, 2013; Wójcikowska & Gaj, 2015). Geni koji imaju značajnu ulogu u formiranju i održavanju SAM takođe imaju značajnu ulogu i u somatskoj embriogenezi, jer njihova ektopična ekspresija indukuje somatsku embriogenezu i pod neinduktivnim uslovima (Gaj *et al.*, 2005). To važi za gene WUS (Zuo *et al.*, 2002; Arroyo-Herrera *et al.*, 2008; Bouchabké-Coussa *et al.*, 2013), LEC (Stone *et al.*, 2001; Chiappetta *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2013), "BABYBOOM" (BBM) (Boutilier *et al.*, 2002), "SHOOTMERISTEMLESS" (STM) (Elhiti *et al.*, 2010), dok ekspresija "ZWILLE" (ZLL) nije uticala na povećanje embriogenog kapaciteta (Elhiti *et al.*, 2010). Zanimljivo je da je ektopična ekspresija "CLAVATA1" (CLV1) suprimirala embriogeni kapacitet arabidopsisa (Elhiti *et al.*, 2010), što nije iznenađujuće s obzirom na činjenicu da CLV1, 2 i 3 suprimiraju ekspresiju WUS i negativnom povratnom spregom kontrolišu veličinu meristema (Schoof *et al.*, 2000).

*PICKLE* (PKL) kodira hromatin-remodelujuću ATP-azu, koja suprimira embriogeni program razvika u somatskim ćelijama (Ogas *et al.*, 1999), pa se ponovno uspostavljanje embriogenog puta razvika u somatskim ćelijama može posmatrati i kao oslobađanje od supresije (Fehér, 2008). Nasuprot tome, BBM takođe indukuje ekspresiju gena za remodelovanje hromatina, ali utiče pozitivno na ekspresiju embriogenog potencijala (Zhou *et al.*, 2004).

#### **1.1.3.6. Molekularni markeri specifični za somatsku embriogenezu**

Identifikacija i karakterizacija marker-gena za somatsku embriogenezu omogućava detektovanje ranih promena somatskih ćelija koje vode ka sticanju kompetencije za embrionalno razviće i pre vidljivih morfoloških promena. Do danas nisu razvijeni citološki markeri za razlikovanje embriogenih od neembriogenih ćelija (Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015).

Kako se za većinu poznatih gena zna da su aktivni tek u kasnijim fazama somatske embriogeneze, ostaje nepoznato koje su molekularne osnove prelaska iz vegetativnog u embriogeni status somatske ćelije (Vergne & Dumas, 2000; Nakano *et al.*, 2006). Ipak, postoje geni za koje se pretpostavlja da bi mogli imati ulogu u ovoj tranziciji (Karami *et al.*, 2009).

### "SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE" (SERK)

Korelacija između ekspresije gena "SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE" (SERK) i sticanja embriogenog potencijala je prvi put detektovana u embriogenoj kulturi šargarepe u prisustvu 2,4-D (Schmidt *et al.*, 1997). SERK se ekspimirao tokom formiranja proembriogene mase ćelija do globularnog stadijuma razvića somatskih embriona, kao i u zigotskim embrionima do ranog globularnog stupnja razvića (Schmidt *et al.*, 1997).

SERK je familija gena, koji kodiraju "receptor-like" kinaze bogate leucinom (*eng.* Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase - LRR-RLK) i imaju funkciju u transdukciji signala (Li, 2010). Vezivanje liganda, koji može biti steroid ili protein, i dimerizacija RLK indukuje fosforilaciju intracelularnog kinaznog domena RLK, koji dalje prenosi signal.

Brojni eksperimenti su pokazali da je povećana ekspresija SERK gena usko povezana sa prelaskom iz vegetativnog na embriogeni model razvića somatske ćelije kod velikog broja biljnih vrsta (Karami *et al.*, 2009). Kod arabidopsisa SERK familiju čini 5 gena (Hecht *et al.*, 2001). Gen *AtSERK1*, koji deli najveći nivo homologije sa prvootkrivenim *DsSERK* genom šargarepe, se ekspimirira na ranom stupnju razvića somatskih embriona, najkasnije do stadijuma srca. Do sada, SERK geni su klonirani kod nekoliko biljnih vrsta, npr. kukuruza (Baudino *et al.*, 2001), *Dactylus glomerata* (Somleva *et al.*, 2000), *Medicago truncatula* (Nolan *et al.*, 2003) i suncokreta (Thomas *et al.*, 2004).

Pošto je ekspresija *DsSERK* prvobitno bila detektovana samo u somatskim i zigotskim embrionima, Schmidt *et al.* (1997) su predložili SERK kao marker gen za somatsku embriogenezu. Ipak, ovaj gen nije apsolutno pouzdan marker za detekciju somatske embriogeneze. Najpre je kod kukuruza (Baudino *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2011a) i *Medicago sp.* (Nishiwaki *et al.*, 2000) pokazano da ekspresija SERK gena nije specifična samo za sticanje kompetencije za somatsku embriogenezu, jer je detektovan jednak nivo

ekspresije i u embriogenom i u neembriogenom kalusu. Opsežnija istraživanja Nolan *et al.* (2003, 2009) ukazuju na kompleksniju ulogu ovih gena u biljnom organizmu. Kod *M. truncatula* ekspresija *MtSERK1* je detektovana u primarnim meristemima korena i izdanka, uključujući i meristeme lateralnih korenova, na spoju različitih tkiva i organa, zatim u prokambijalnim ćelijama provodnih elemenata. Osim toga, ekspresija *SERK* je detektovana i tokom kaulogeneze suncokreta (Thomas *et al.*, 2004), u mikrotuberima krompira tokom razvića izdanaka (Sharma *et al.*, 2008a), pluripotentnim ćelijama prokambijuma provodnih elemenata arabidopsisa (Kwaaitaal & de Vries, 2007), primordijama lateralnih korenova arabidopsisa (Kwaaitaal *et al.*, 2005), u ćelijama embrionove kesice i embrionu do stadijuma srca, u primordijama antera, a zatim u tapetumu (Kwaaitaal *et al.*, 2005). Povećana ekspresija *SERK* je detektovana i tokom odbrane od napada patogena kod pirinča (Hu *et al.*, 2005).

#### "LEAFY COTYLEDON" (LEC)

Tokom rane embriogeneze "*LEAFY COTYLEDON*" (*LEC*) geni održavaju identitet ćelija suspenzora i određuju identitet kotiledona (Meinke, 1992; Meinke *et al.*, 1994), dok tokom kasne embriogeneze započinju maturaciju i sprečavaju prerano klijanje embriona (Lotan *et al.*, 1998; Stone *et al.* 2001, 2008).

*LEC* geni kodiraju transkripcione faktore. Ektopična ekspresija *LEC1*, *LEC2* ili *LEC1-LIKE (LIL)* je dovoljna za indukciju somatskih embriona iz vegetativnih ćelija (Stone *et al.*, 2001; Chiappetta *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2013). *LEC* geni promovišu somatsku embriogenezu i u odsustvu auksina (Stone *et al.*, 2001), što nije iznenađujuće, s obzirom da *LEC2* indukuje ekspresiju *YUC* gena koji kodiraju enzime za biosintezu auksina (Wójcikowska *et al.*, 2013; Wójcikowska & Gaj, 2015). *LEC* geni su predloženi kao marker geni za somatsku embriogenezu i do sada nisu publikovani podaci koji dovode u pitanje njihovu specifičnost (Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015).

"BABYBOOM" (BBM)

"BABYBOOM" (BBM) gen je izolovan iz mikrospora *Brassica napus* (Boutilier *et al.*, 2002). *BBM* kodira domen 2 "Apetala" transkripcionog faktora i utiče na povećanje kompetencije ćelija za somatsku embriogenezu, a njegova ektopična ekspresija povećava embriogeni kapacitet ćelija i bez egzogenih BRR (Boutilier *et al.*, 2002). Ektopična ekspresija *BBM* indukuje ekspresiju gena za deacetilazu histona (*Hd2A*, *Hd2B* i *Hd2C*), ukazujući na njihovu ulogu u remodelovanju hromatina (Zhou *et al.*, 2004).

"WUSCHEL" (WUS)

"WUSCHEL" (WUS) je transkripcioni faktor koji održava "stem" ćelije u nediferenciranom stanju i reguliše veličinu SAM (Bhalla & Singh, 2006). Ektopična ekspresija *WUS* stimuliše organogenezu i somatsku embriogenezu (Zuo *et al.*, 2002; Arroyo-Herrera *et al.*, 2008; Bouchabké-Coussa *et al.*, 2013). Smatra se da *WUS* promovise tranziciju iz neembriogenog u embriogeno stanje stimulacijom ekspresije *LEC* gena (Zheng *et al.*, 2014). *WUS* se smatra dobrim markerom za somatsku embriogenezu (Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015).

"PICKLE" (PKL)

Gen "PICKLE" (*PKL*) kodira protein koji vrši remodelovanje hromatina (Ogas *et al.*, 1999). Smatra se da *PKL* vrši represiju *LEC1* i drugih regulatora embriogeneze i time reguliše prelazak sa embriogenog na vegetativno razviće (Rider *et al.*, 2003).

Pored ovih najviše ispitavanih, poznato je da ulogu u prelasku iz vegetativnog u embriogeno stanje somatske ćelije imaju i geni: "AGAMOUS LIKE 15" (*AGL15*), "*Medicago truncatula* SOMATIC EMBRYO RELATED FACTOR1" (*MtSERF1*), "*Medicago truncatula* STRESS KINASE1" (*MtSK1*), "GLUTATHION-S-TRANSFERASE" (*GST*), "GERMIN-LIKE PROTEIN" (*GLP*), "EMBRIOGENIC CELL PROTEIN" (*ECP*) i geni za Trx H proteine. Način na koji ovi geni prevode ćeliju iz vegetativnog u embriogeno stanje još uvek nije razjašnjen.

Do sada, nijedan gen spanaća uključen direktno u indukciju somatske embriogeneze nije kloniran.

#### 1.1.4. Androgeneza i ginogeneza

Androgeneza i ginogeneza su procesi razvića embriona iz haploidnih ćelija mikroskora, odnosno makroskora (Shariatpanahi *et al.*, 2006; Bohanec, 2009; Seguí-Simarro, 2010). Ova dva procesa predstavljaju specijalne slučajeve embriogeneze, koji se razlikuju od zigotske i somatske embriogeneze po tome što se dešavaju u ćelijama gameta, pri čemu se program razvića menja iz gametofitnog u sporofitni (Sunderland & Dunwell, 1977). Razviće embriona iz mikroskora može biti direktno i indirektno. U prvom slučaju svaka mikroskora se deli i razvija u embrion. Kod indirektno androgeneze iz mikroskora se razvija kalus, a zatim se u njemu, podešavanjem odnosa auksin/citokinin, mogu indukovati pupoljci, korenovi ili somatski embrioni.

U prirodi je pojava haploida vrlo retka i dešava se tokom procesa apomiksisa, odnosno razvića embriona bez fertilizacije jajne ćelije (Koltunow & Grossniklaus, 2003) ili u slučaju eliminacije ili inaktivacije nukleusa suprotnog pola nakon oplodjenja (Seguí-Simarro, 2010). U uslovima *in vitro*, androgeneza je prvi put indukovana iz polena *Ginkgo biloba* (Tulecke, 1953), ali joj je veća pažnja posvećena tek nakon indukcije embriona u kulturi antera *Datura innoxia* (Guha & Maheswari, 1964). Androgeneza može biti indukovana *in planta*, iz izolovanih cvetnih pupoljaka, antera ili mikroskora (Touraev *et al.*, 1997; Čalić *et al.*, 2003/2004).

Mnogi faktori utiču na efikasnost procesa androgeneze, od kojih su najvažniji: genotip, stadijum razvića mikroskora i faktori stresa (Touraev *et al.*, 2001; Seguí-Simarro, 2010). Genotip ima izuzetno snažan uticaj (Touraev *et al.*, 2001). Kod najvećeg broja vrsta vreme kad se embriogeneza može indukovati je period od jednojedarnog stadijuma mikroskora do ranog dvoćelijskog stadijuma polena, odnosno u vreme prve mitoze (Touraev *et al.*, 2001). Kod biljnih vrsta kod kojih se teže indukuje androgeneza, ovaj vremenski okvir je još kraći. Za razliku od somatske embriogeneze, za indukciju androgeneze je ključno delovanje nekog faktora fizičkog stresa, dok BRR imaju manji značaj (Touraev *et al.* 2001; Shariatpanahi *et al.*, 2006). Najčešće se primenjuje hlađenje

(4-10°C), toplotni stres (33-37°C), kolhicin ili gladovanje (biljke se gaje na podlozi u kojoj se nalazi izvor ugljenika koji biljne ćelije ne mogu da metabolizuju, npr. manitol) (Touraev *et al.*, 2001). Ređe se koriste ABA, redukovan atmosferski pritisak, centrifugiranje,  $\gamma$ -zračenje, alkalna sredina ili joni teških metala (Shariatpanahi *et al.*, 2006).

Embriogeno razviće počinje postavljanjem nukleusa u centar mikrospore, nestankom velike centralne vakuole i promenama u citoskeletu (Seguí-Simarro & Nuez, 2008). Izuzetno efikasan model-sistem za indukciju embriogeneze mikrospora *Brassica napus* toplotnim stresom je omogućio uvid u ovaj proces (Soriano *et al.*, 2014). Najnovija istraživanja ukazuju da je remodelovanje hromatina ključan događaj za uključanje embriogenog razvića i da verovatno stres deluje preko istog mehanizma (Li *et al.*, 2014). Naime, pokazano je da inhibicija deacetilacije histona H3 i H4 dramatično povećava embriogeni kapacitet mikrospora *B. napus* i da pod tim uslovima toplotni stres nije potreban za indukciju embriogeneze, mada doprinosi povećanju njegove efikasnosti (Li *et al.*, 2014). Tretman istim inhibitorom (trihostatinom) je indukovao embriogenezu mikrospora arabidopsisa, kod koga je ovaj proces prethodno bio potpuno neuspešan, što potvrđuje da je hiperacetilaciju histona H3 i H4 izuzetno važan, možda i ključan događaj za indukciju embriogeneze iz mikrospora (Li *et al.*, 2014).

U kulturi mikrospora *B. napus* je već posle 2-3 dana detektovana ekspresija gena *BMB*, *LEC1* i *LEC2* (Malik *et al.*, 2007). Osim ovih, u androgenim embrionima 7 dana od početka indukcionog tretmana je detektovana ekspresija 16 molekularnih markera, a njihova kvantitativna ekspresija je precizno odražavala embriogeni kapacitet različitih sorti *B. napus*. Isti geni se specifično ekspimiraju i u zigotskim embrionima, što potvrđuje ranije pretpostavke o sličnosti razvića embriona bez obzira na njihovo poreklo (Malik *et al.*, 2007). Tokom androgeneze je detektovan povišen nivo proteina toplotnog stresa (*eng.* Heat Shock Proteins -HSP) i enzima antioksidativnog sistema (Bárány *et al.*, 2001; Maraschin *et al.*, 2005; Žur *et al.*, 2014).

Slično androgenezi, ginogeneza se može indukovati iz neoplođenih cvetnih pupoljaka ovarijuma ili ovula (Bohanec, 2002, 2009). Za razliku od androgeneze, BRR imaju veću ulogu u indukciji ginogineze nego stres. Da bi se stimulisalo razviće jajne ćelije bez oplodjenja, često se pribegava stavljanju nevijabilnog ili ozračenog polena na tučak.



Ginogeneza je kod nekih biljnih vrsta, npr. crnog luka i šećerne repe, jedini način produkcije haploida i dihaploida, pošto androgeneza nije bila uspešna ni posle opsežnih istraživanja (Bohanec, 2002).

Androgeni i ginogeni embrioni se razvijaju u haploidne biljke koje su sterilne. Spontano, endoreduplikacijom dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), ili indukovanom diploidizacijom (kolhicinom ili nekom drugom supstancom koja inhibira mitozu), nastaju dihaploidi, jedinke sa dve identične garniture hromozoma. Dihaploidi imaju značajnu ulogu u oplemenjivanju biljaka, pošto su izvor varijabilnosti, jer kod njih dolaze do izražaja i recesivne osobine (Dunwell, 2010). Analogi su čistim linijama, ali se za razliku od njih dobijaju za značajno kraće vreme i uz ulaganje manje rada. Posebno su značajni za oplemenjivanje biljnih vrsta čiji životni ciklus traje izuzetno dugo, kao kod drvenastih vrsta (Radojević, 1978), kod vrsta kod kojih se ne mogu dobiti čiste linije jer se mogu samooploditi samo u 2-3 ciklusa zbog letalnog efekta recesivnih gena u homozigotnom stanju (npr. crni luk) (Bohanec, 2002) ili vrsta kod kojih postoji inkompatibilnost prema sopstvenom polenu. Suspenzija mikrospora je izuzetno koristan model-sistem za studiranje procesa embriogeneze, pošto se uslovi pod kojima se odvija mogu bolje kontrolisati zbog odsustva materinskog tkiva (Soriano *et al.*, 2014).

## **1.2. Interakcija svetlosti, auksina i giberelina u promociji morfogeneze biljaka**

Proučavanjem mehanizama regeneracije *in vitro* različitih biljnih vrsta uočen je značaj koji za ove procese imaju svetlost, auksini i giberelini, kao i njihova međusobna interakcija. Tokom evolucije biljke su razvile mehanizme kojim usklađuju svoje rastenje i razviće sa promenama u okruženju. Od spoljašnjih faktora, svetlost ima najznačajniji uticaj na rastenje i razviće biljaka (de Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008), jer donosi informacije biljci o dnevno-noćnom ciklusu (Yamashino *et al.*, 2003; Nozue *et al.*, 2007) i godišnjem dobu (Wingler, 2015). Ti signali i signali pokrenuti različitim faktorima stresa se uključuju u signalne puteve fitohormona (Claeys *et al.*, 2014), koji zatim regulišu rastenje biljnog organizma (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009; Nelissen *et al.*, 2012) u skladu sa uslovima u okruženju.

### 1.2.1. Percepcija svetlosti

Svetlost je izvor energije za biljne organizme, ali i ključan faktor iz okruženja koji biljkama signalizira vreme i promene u okruženju kroz fizičke parametre: kvalitet, intenzitet, pravac i trajanje svetlosti (Chen *et al.*, 2004). Biljke detektuju svetlost u rasponu od 280 nm do 750 nm pomoću pet grupa fotoreceptora, čiji se apsorpcioni spektri delimično preklapaju. UV i plavu svetlost apsorbuju kriptohromi (CRY), fototropini (PHOT) i ZTL proteini, dok crvenu (R) i daleko crvenu (FR) svetlost apsorbuju fitohromi (PHY).

Iz arabidopsisa je izolovano pet fitohroma: PHYA - PHYE. Svaki PHY može imati dve stabilne forme: neaktivnu formu Pr koja apsorbuje R svetlost, sa maksimumom apsorpcije na 660 nm i aktivnu Pfr formu, koja apsorbuje FR svetlost, sa maksimumom apsorpcije na 730 nm (Rockwell *et al.*, 2006).

Posle fotoaktivacije, svih pet PHY se transportuju u nukleus (Yamaguchi *et al.*, 1999; Kircher *et al.*, 2002), ali tek posle interakcije sa specifičnim citoplazmatičnim proteinima. Na taj način aktivnost PHY ne zavisi samo od broja aktiviranih molekula u citoplazmi, već i od protein-protein interakcije sa molekulima koji vrše dalju transdukciju signala (Hiltbrunner *et al.*, 2005; Pfeiffer *et al.*, 2012). Za razliku od PHYA, koji nije prisutan u nukleusima biljaka gajenih u mraku, ali se već posle 1-2 min od aktivacije R svetlošću može detektovati u nukleusu (Bauer *et al.*, 2004), nizak nivo PHYB je prisutan u nukleusu ćelija čak i u mraku, a maksimum dostiže tek 4 h posle izlaganja R svetlosti (Kircher *et al.*, 2002).

Aktivirani fotoreceptori se transportuju u tzv. nuklearna fototela (Liu *et al.*, 2011; Chen & Chory, 2011), koja predstavljaju subnuklearne domene u kojima se odvija modifikacija proteina, a zatim degradacija represora i aktivacija ekspresije gena (Shaw & Brown, 2004). Rana fototela nestaju 1 h posle delovanja R svetlosti (Bauer *et al.*, 2004), ponovo se javljaju posle 2 h na R svetlosti i ostaju prisutna tokom celokupnog perioda osvetljenja (Yamaguchi *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 2004). Fototela mogu da sadrže i aktivirane CRY1 i CRY2, ali su oni fotolabilni i brzo se degradiraju na plavoj svetlosti, pa se javljaju samo u ranim fototelima (Liu *et al.*, 2011). Broj i veličina fototela na kontinuiranoj R svetlosti su proporcionalna procentu PHYB u Pfr formi u datom momentu

(Chen *et al.*, 2003), a PHYB je fitohrom sa najvažnijim funkcijama u kontroli rasteња i razvića biljaka (Nagy & Schäfer, 2002).

Smatra se da aktivirani fotoreceptori u nukleusu modulišu stabilnost pozitivnih i negativnih transkripcionih faktora i izazivaju velike promene u ekspresiji gena (Tepperman *et al.*, 2006; Jiao *et al.*, 2007). PHY stabilizuju pozitivne regulatore transkripcije, poput "*LONG HYPOCOTYL 5*" (HY5), represijom E3 ubikvitinskih ligaza (Chen & Chory, 2011; Liu *et al.*, 2011). "PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR" (PIF) proteini pokreću ubikvitinizaciju PHYA i PHYB i time modulišu njihovo delovanje na svetlosti (Jang *et al.*, 2010).

### 1.2.2. Uticaj svetlosti na biosintezu i transport auksina

Uticaj svetlosti na nivo i distribuciju auksina u biljnom organizmu je garancija da će njegovo rasteње biti usklađeno sa osvetljenjem u okruženju (Halliday *et al.*, 2009). Svetlost indukuje sintezu auksina u mladim listovima (Bhalerao *et al.*, 2002). Auksin se zatim distribuira po celom klijancu i uspostavlja gradijent koncentracije (Grieneisen *et al.*, 2007). Svetlost kontroliše distribuciju auksina u klijancu i osetljivost individualnih ćelija prema auksinu (Halliday & Fankhauser, 2003; Salisbury *et al.*, 2007).

Svetlost utiče na biosintezu auksina tako što aktivirani PHYB stimuliše ekspresiju "*SUPERROOT 2*" (*SUR2*) i inhibira ekspresiju "*TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE*" (*TAA1*) gena. *SUR2* je citohrom P450 monooksigenaza koja reguliše ravnotežu između IAA i indol glukozinolata i smanjuje koncentraciju slobodne IAA, a *TAA1* je triptofan aminotransferaza, koja katalizuje konverziju triptofana u IAA (Hoecker *et al.*, 2004; Grubb & Abel, 2006). Dvostruka, pozitivna i negativna, kontrola omogućava precizniju kontrolu biosinteze IAA. Osim toga, PHYA i PHYB regulišu transkripciju "*GRETCHEN HAGEN 3*" (*GH3*) gena (Tanaka *et al.*, 2002), koji kodiraju konjugaciju IAA i amino kiselina, pri čemu nastaje pul rezervne IAA ili se na ovaj način IAA dalje degradira (Staswick *et al.*, 2005).

Takođe, pokazano je da svetlost utiče i na aktivni polarni transport auksina delujući na PIN i PGP proteine, koji uspostavljaju lokalni gradijent auksina (Grieneisen *et al.*, 2007;

Titapiwatanakun & Murphy, 2009), ali i na intracelularnu distribuciju PIN, lokalizaciju u membrani i redukciju njihove razgradnje u vakuoli (Laxmi *et al.*, 2008).

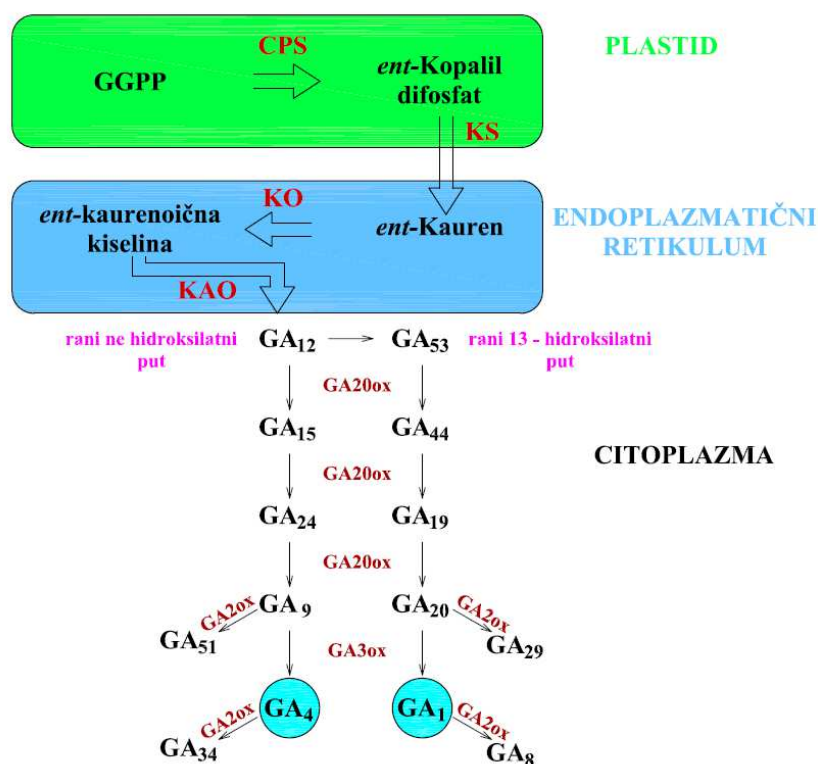
### 1.2.3. Biosinteza i metabolizam giberelina

Giberelini su biljni hormoni otkriveni kao produkti gljive *Gibberella*, po kojoj su i dobili ime. Kasnije je pokazano da se oni sintetišu u svim biljkama. U ovu grupu spada preko sto jedinjenja koja u svojoj strukturi imaju gibanski prsten (Nakayama *et al.*, 2001). Uobičajno je da se za sve gibereline koristi skarćenica GA (*eng.* Gibberellic Acid - giberelna kiselina) sa rednim brojem od GA<sub>1</sub> do GA<sub>n</sub>. Sam termin giberelna kiselina je rezervisan za prvoizolovani giberelin - GA<sub>3</sub>. GA se sintetišu u tkivima koja aktivno rastu, kao što su apikalni delovi stabla, mladi listovi, korenovi, nezrela semena i plodovi. Sa mesta sinteze GA se transportuju kroz biljku u svim pravcima, iz korena transpiracionim tokom, a iz apikalnih delova epikotila floemom. Po hemijskoj građi GA su diterpenoidi.

Biosinteza GA je složen proces koji započinje sukcesivnom kondenzacijom četiri izoprenske jedinice nastale u proplastidima, pri čemu se formira geranilgeranil-pirofosfat (GGPP), od kojeg se granaju biosintetski putevi velikog broja jedinjenja. U plastidima se GGPP ciklizuje pod uticajem *ent*-kopalil difosfat sintaze (CPS), čime nastaje *ent*-kopalil difosfat (Sl. 1). Naredni korak se odvija u endoplazmatičnom retikulumu i podrazumeva oksidaciju *ent*-kopalil difosfata u *ent*-kauren, koji je prvi stabilni i specifični prekursor GA. Ovu oksidaciju vrši enzim *ent*-kauren sintaza (KS). Takođe, u endoplazmatičnom retikulumu, pod uticajem *ent*-kauren oksidaze (KO) *ent*-kauren prelazi u *ent*-kaurenoičnu kiselinu (Sl. 1). KO je citohrom-P450 zavisna monooksigenaza, kao i oksidaza *ent*-kaurenoične kiseline (KAO), koja katalizuje nastanak GA<sub>12</sub> (Sl. 1). GA<sub>12</sub> je prvo jedinjenje sa giberelinskom strukturom i on je prekursor svih GA (Hedden & Kamya, 1997). Naredni koraci se odvijaju u citoplazmi zahvaljujući solubilnim 2-oksoglutarat zavisnim dioksigenazama. GA dioksigenaze su multifunkcionalni enzimi sa širokom specifičnošću prema supstratu. GA<sub>20</sub> oksidaza (GA<sub>20</sub>-ox) i GA<sub>3</sub> oksidaza (GA<sub>3</sub>-ox) katalizuju završne korake u sintezi bioaktivnih GA (Lange, 1998; Hedden & Philips, 2000; Reid *et al.*, 2004; Radi *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007). Ove enzime kodiraju familije gena; npr. kod arabidopsisa GA<sub>20</sub>-ox kodira familija od 5 gena (Phillips *et al.*, 1995), a GA<sub>3</sub>-ox

kodira familija od 4 gena (Hedden & Phillips, 2000). Hidroksilacijom  $3\beta$ -ugljenika nastaje bioaktivni  $GA_4$  (Sl. 1), dok hidroksilacijom  $13\beta$ -ugljenika nastaje bioaktivni  $GA_1$  (Sl. 1). Kod spanaća je dominantan  $13\beta$ -hidroksilatni put (Graebe, 1987; Talon *et al.*, 1991; Lee & Zeevaart, 2005), pa je iz tog razloga on detaljnije prikazan. Smatra se da sve korake oksidacije  $GA_{12}$  do  $GA_{20}$  vrši isti enzim  $GA_{20}$ -ox (Glimour *et al.*, 1986; Zeevaart *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1996; Lee & Zeevaart, 2002). Hidroksilacijom na C- $3\beta$  atomu  $GA_{20}$  pod uticajem  $GA_3$ -ox nastaje bioaktivni  $GA_1$ . Bioaktivni  $GA_1$  i  $GA_4$  prelaze u neaktivne  $GA_8$ , odnosno  $GA_{34}$  pod uticajem  $GA_2$  oksidaze ( $GA_2$ -ox) (Coles *et al.*, 1999). Kod arabidopsisa  $GA_2$ -ox kodira familija od 8 gena (Thomas *et al.*, 1999; Hedden & Phillips, 2000).

Skoro svaki giberelin može nastati na više načina, s tim što se putevi biosinteze razlikuju kod biljnih vrsta. Kod spanaća  $GA_1$  je prvi *per se* aktivan giberelin (Hedden, 1990; Nakayama *et al.*, 1990).



**Slika 1** - Biosintetski put giberelina (GA). GGPP: geranilgeranil-pirofosfat, CPS: *ent*-kopalil difosfat sintaza, KS: sintaza *ent*-kaurena, KO: *ent*-kauren oksidaza, KAO: sintaza *ent*-kaurenoične kiseline,  $GA_{20}$ ox:  $GA_{20}$ -oksidaza,  $GA_3$ ox:  $GA_3$ -oksidaza,  $GA_{20}$ ox:  $GA_2$ -oksidaza. Adaptirano prema Sawada *et al.* (2008) i Israelsson *et al.* (2004).

#### 1.2.4. Interakcija svetlosti i giberelina

Svetlost kontroliše procese morfogeneze u interakciji sa GA. Oba faktora deluju indirektno, preko složene interakcije aktivatora i represora, koji zatim modulišu ekspresiju nizvodnih gena, čiji produkti izvršavaju program rastenja i razvića. Do sada je najbolje proučen proces izduživanja hipokotila arabidopsisa, pa će on biti opisan kao primer.

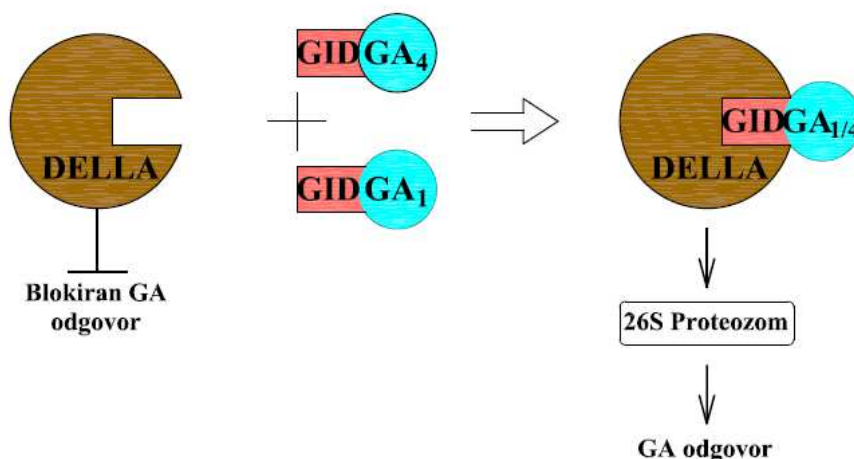
Izduživanje hipokotila se odvija na svetlosti (fotomorfogeneza) ili u mraku (skotomorfogeneza). Svetlost indukuje fotomorfogenezu i inhibira rastenje hipokotila, a GA promovišu skotomorfogenezu (etioloirano rastenje), koje karakteriše povećano izduživanje hipokotila. Koji od dva puta će biti uključen zavisi od fine regulacije aktivatora i represora sa transkripcionim faktorima i nivoa bioaktivnih GA. Svetlost deluje preko fitohroma, a GA preko DELLA proteina.

R svetlost konvertuje fitohrom u aktivnu formu, koji zatim prelazi u nukleus (Huq *et al.*, 2003) i interaguje sa PIF proteinima. PIF proteini su transkripcioni faktori sa DNK vezujućim "helix-loop-helix" (HLH) domenom, koji vrše modulaciju ekspresije gena koji učestvuju u fotomorfogenezi (izduživanju hipokotila, biosintezi hlorofila, klijanju semena itd). U nukleusu, fitohrom fosforiliše PIF3, PIF4, PIF1 i PIF5, koji se zatim degradiraju u proteozomima (Al-Sady *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007; De Lucas *et al.*, 2008). PIF3 i PIF4 imaju funkciju u kontroli izduživanja hipokotila, dok ostali PIF kontrolišu druge procese morfogeneze.

DELLA su represorni proteini koji nemaju DNK-vezujući domen, pa ne deluju direktno na promotore gena, već na transkripcione faktore u protein-protein interakciji (Feng *et al.*, 2008). Na N-terminusu DELLA represora se nalazi regulatorni domen sa konzervisanom amino-kiselinskom sekvencom Asp-Glu-Leu-Leu-Ala (DELLA), po kome je ova grupa proteina dobila naziv, a na C-terminusu je GRAS domen (Itoh *et al.*, 2002). Kod arabidopsisa je poznato 5 DELLA proteina, a kod ječma i pirinča po jedan.

Pokazano je da GA kontrolišu nivo DELLA proteina (Fu *et al.*, 2002). Da bi interagovao sa DELLA, GA se vezuje za svoj nuklearni receptor "GA INSENSITIVE DWARF1" (GID1), a zatim se ceo kompleks vezuje za DELLA (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005) (Sl. 2). *GID1* kodira lipazu, čiji N-terminus u hidrofobnoj interakciji sa laktonskim prstenom GA zauzima konformaciju koja omogućava interakciju sa DELLA represorom

(Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005, 2007). Kompleks GA-GID1-DELLA interaguje sa "SLEEPY1" (SLY1), čime započinje njegova ubikvitinacija i degradacija u 26S proteozomima (Sl. 2) (Dill *et al.*, 2004). Specifični inhibitor 26S proteozoma (MG123) inhibira degradaciju DELLA, kao i paklobutrazol, koji inhibira biosintezu GA. Svih pet poznatih DELLA proteina arabidopsisa je pod negativnom kontrolom GA i svi se degradiraju istim mehanizmom u proteozomima (Feng *et al.*, 2008). Proces destrukcije DELLA različito traje u različitim tkivima i kod mutanta koji ne sintetišu GA traje od 10 min u klijancima i do 5 h u semenima (Zhang *et al.*, 2011b).



**Slika 2** – Signalni put giberelina (GA). GA najpre interaguje sa receptorom GID ("GA INSENSITIVE DWARF"), a zatim kao kompleks interaguje sa DELLA proteinima i upućuje ih na degradaciju u 26S proteozom. Adaptirano prema Dugardeyn *et al.* (2008).

DELLA i PIF takođe interaguje. DELLA blokira funkciju PIF3 i PIF4, jer se vezuje za njihov HLH domen i blokira njegovo vezivanje za DNK (Park *et al.*, 2004; De Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008). DELLA ne utiču na interakciju PHYB i PIF3, niti se mogu vezati za PIF3 kad je vezan za DNK, odnosno promotor gena čiju ekspresiju reguliše (Feng *et al.*, 2008).

U mraku, PIF3 i PIF4 deluju pozitivno na izduživanje ćelija hipokotila (Huq & Quail, 2002). DELLA blokira aktivaciju ekspresije gena za razviće hipokotila, a GA stimuliše rastenje hipokotila destrukcijom DELLA i oslobađanjem inhibicije PIF (De Lucas

*et al.*, 2008). Osim toga, GA negativno reguliše HY5 u mraku povećanjem ekspresije "CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1" (*COP1*), koji kodira ubikvitinsku ligazu za degradaciju HY5 (Alabadí *et al.*, 2008).

Na R svetlosti, PIF3 i PIF4 interaguju sa aktivnom formom fitohroma i bivaju razgrađeni, a HY5 preuzima kontrolu nad izduživanjem hipokotila (Alabadí & Blázquez, 2009). Poluživot PIF1 i PIF3 na R svetlosti je 10-15 min. Za degradaciju PIF3 su potrebni PHYA, B i D, a *COP1* je neophodan za stabilnost PIF3 u mraku (Bauer *et al.*, 2004). PIF proteini se ponovo akumuliraju u mraku (Nozue *et al.*, 2007).

HY5 negativno deluje na izduživanje hipokotila, a svetlost ga stabilizuje (Osterlund *et al.*, 2000). HY5 je transkripcioni faktor, koji se konstitutivno i direktno vezuje za regulatorne sekvence nizvodnih gena, promoviše metilaciju histona u oblasti ciljnih gena i održava represiju gena za izduživanje hipokotila (Jing *et al.*, 2013). Sa HY5 direktno interaguje "PICKLE" (PKL), kasnije označen kao "ENHANCED PHOTOMORPHOGENIC1" (EPP1), koji remodeluje hromatin (Jing *et al.*, 2013). PKL/EPP1 oslobađa histone represije koju vrši HY5, čime se aktivira ekspresija nizvodnih gena (Jing *et al.*, 2013). Svetlost inhibira transkripciju *PKL/EPP1* i zato redukuje izduživanje hipokotila, dok u mraku PKL/EPP1 oslobađa nizvodne gene represije od strane HY5 (Jing *et al.*, 2013).

Drugi proces morfogeneze, klijanje fotoblastičnih semena, takođe kontrolišu GA i svetlost. FR svetlost blokira klijanje semena inhibicijom biosinteze GA, kroz inhibiciju ekspresije *GA3-ox* i indukciju ekspresije *GA2-ox*, dok R svetlost ili hladni tretman stimuliše klijanje indukcijom ekspresije *GA20-ox* i *GA3-ox* i inhibicijom ekspresije *GA2-ox* (Penfield *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007).

Gornji primeri ilustruju kompleksnost interakcije GA i svetlosti, ali se saznanja stečena proučavanjem ovih pojava ne mogu jednostavno ekstrapolirati na druge fiziološke procese koji se odvijaju u različitim biljnim organima. Claeys *et al.* (2014) čak smatraju da je kompleksna mreža interakcije GA, DELLA, fitohormona i transkripcionih faktora specifična za tip ćelije.



### 1.2.5. Uticaj svetlosti na biosintezu giberelina

Rozetaste biljke dugog dana, kao što je spanać, rastu vegetativno u uslovima kratkog dana (KD), dok u uslovima dugog dana (DD) dolazi do cvetanja izdanka i smanjene multiplikacije. Prisustvo GA<sub>3</sub> u medijumu indukuje cvetanje spanaća i u uslovima KD (Ćulafić, 1973). Smatra se da do izduživanja biljke usled promene fotoperioda dolazi posredstvom GA. Od ranije je poznato da fotoperiod kod spanaća reguliše poslednja dva koraka u biosintezi GA (Gilmour *et al.*, 1986; Talon *et al.*, 1991). Smatra se da je za ove tranzicije odgovoran enzim GA20-ox, čija je aktivnost regulisana fotoperiodom (Wu *et al.*, 1996). Detektovana je veća količina GA20-ox iRNK u uslovima DD nego KD ili u mraku (Wu *et al.*, 1996). Dalji metabolizam GA<sub>20</sub> je brži u uslovima DD nego u uslovima KD (Metzger & Zeevaart, 1982), ali i tretman retardantima rastenja daje mnogo brži pad sadržaja GA kod biljaka spanaća gajenih u uslovima DD nego kod onih gajenih u uslovima KD. Ipak, smatra se da veza fotoperioda i sinteze GA nije tako jednostavna i da cirkadijalni ritam može igrati veliku ulogu.

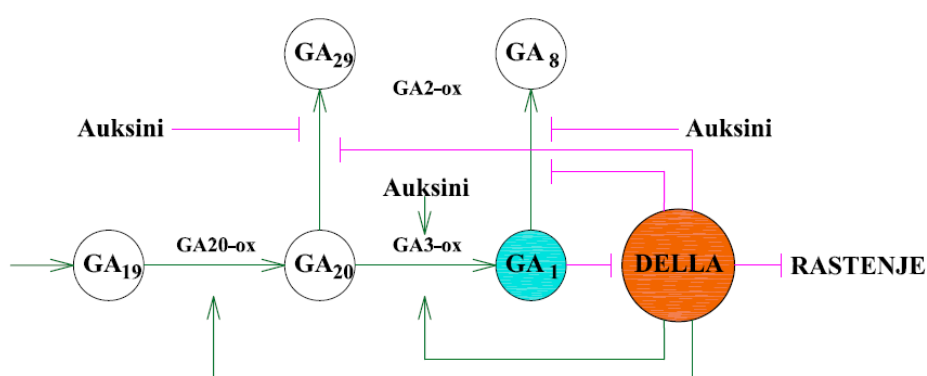
### 1.2.6. Inetrakcija giberelina sa drugim fitohormonima

Plastičnost koju biljke pokazuju tokom razvića, u skladu sa promenama u okruženju, je moguća zahvaljujući vrlo kompleksnoj mreži signalnih puteva koji se prepliću. BRR imaju značajno mesto u povezivanju promena u okruženju sa modulacijom rastenja i razvića biljnog organizma (Lau & Deng, 2010; Rymen & Sugimoto, 2012), a ukrštanje signalnih puteva i interakcija hormona je dodatni nivo regulacije rastenja i razvića biljnog organizma (Depuydt & Hardtke, 2011).

Interakcija GA i auksina kontroliše rasteње i razviće većine biljnih organa. U skladu s tim, njihovi transkriptomi se preklapaju (Björklund *et al.*, 2007). Međutim, u njihovoj interakciji, koja podrazumeva efekat jednog hormona na nivo drugog hormona, auksini imaju značajnije mesto, jer GA samo neznatno utiču na povećanje nivoa auksina, dok auksini značajno utiču na povećanje bioaktivnih GA (Ross *et al.*, 2003). GA povećavaju nivo IAA stimulacijom polarnog transporta auksina (Björklund *et al.*, 2007).

Auksini indukuju biosintezu GA stimulacijom ekspresije GA3-ox i represijom GA2-ox (Ross *et al.*, 2000; Wolbang and Ross, 2001; Wolbang *et al.*, 2004), regulacionim

mehanizmom koji ne uključuje DELLA proteine (Frigerio *et al.*, 2006; O'Neill *et al.*, 2010). Na osnovu poznatih činjenica, O'Neill *et al.* (2010) su predložili model interakcije auksina, GA i DELLA u održavanju homeostaze bioaktivnih GA (Sl. 3). Po tom modelu, auksini stimulišu akumulaciju bioaktivnih GA (Ross *et al.*, 2000), a povišen nivo GA negativnom povratnom spregom inhibira sopstvenu biosintezu (Yamaguchi, 2008). DELLA proteini stimulišu akumulaciju bioaktivnih GA stimulacijom ekspresije *GA3-ox* i inhibicijom ekspresije *GA2-ox* (Zentella *et al.*, 2007; Weston *et al.*, 2008).



**Slika 3** - Model interakcije auksina, GA i DELLA u održavanju homeostaze bioaktivnih giberelina (GA), GA20-ox: GA20-oksidaza, GA3-ox: GA3-oksidaza, GA2-ox: GA2-oksidaza. Zelenim strelicama je označena stimulacija ekspresije, a ružičastim inhibicija. Adaptirano prema O'Neill *et al.* (2010).

Auksini kontrolišu rastenje korenova modulacijom odgovora ćelije na GA (Fu & Harberd, 2003). Auksin je neophodan za kontrolu rasteња korena od strane GA i svaka promena u transportu auksina i transdukciji signala odlaže interakciju GA-DELLA i ubikvitinaciju DELLA (Fu & Harberd, 2003). IAA utiče na povećanje nivoa GA<sub>1</sub> kod graška, regulacijom ekspresije *GA3-ox* i *GA2-ox* gena (Ross *et al.*, 2000; O'Neil & Ross, 2002). Naftil sirćetna kiselina (NAA) povećava nivo transkripcije gena za *GA20-ox1* i *GA20-ox2*, ali nema efekta na ostale članove iste genske familije (*GA20-ox3* i *GA20-ox4*) kod arabidopsisa (Frigerio *et al.*, 2006). Smatra se da SAM kontroliše rastenje organa biljke preko auksina koji utiču na destabilizaciju DELLA posredstvom GA (Fu & Harberd, 2003). Uklanjanje SAM inhibira rastenje primarnog korena arabidopsisa, a inhibicija nestaje primenom IAA na mesto dekapitovanog SAM (Fu & Harberd, 2003).

GA kontrolišu ekspanziju ćelija korena arabidopsisa uticajem na polarni transport auksina. Naime, DELLA proteini indukuju ekspresiju transkripcionog faktora "*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR1*" (*ARR1*), iz signalnog puta citokinina, koji posredno vrši represiju gena *PIN*, čime se redukuje transport auksina neophodan za deobu ćelije (Moubayidin *et al.*, 2010). Za efikasan polarni transport auksina i akumulaciju *PIN1*, *PIN2*, *PIN3* i *PIN4* je neophodna biosinteza GA (Willige *et al.*, 2011). S druge strane, auksin i etilen utiču na interakciju GA i DELLA (Achard *et al.*, 2003).

Na inhibiciju diferenciranja lateralnih korenova utiče interakcija GA, auksina i ABA i može se objasniti modifikacijom polarnog transporta auksina (Gou *et al.*, 2010; Duan *et al.*, 2013).

DELLA učestvuju u regulaciji skotomorfogeneze direktnom interakcijom sa faktorom koji vrši remodelaciju hromatina PKL/EPP1. PKL/EPP1 interaguje sa transkripcionim faktorima PIF3 i "*BRASSINAZOLE RESISTANT1*" (*BZR1*) i reprimira trimetilaciju histona H3 u oblasti promotora ciljnih gena i omogućava njihovu ekspresiju, dok DELLA smanjuju vezujuću sposobnost PKL (Zhang *et al.*, 2014).

GA i DELLA učestvuju u signalnom putu brasinosteroida, etilena, ABA i jasmonske kiseline. Degradacija DELLA oslobađa inhibicije pozitivni regulator iz signalnog puta brasinosteroida, koji zatim indukuju ekspresiju gena čiji proizvodi učestvuju u ekspanziji ćelija (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2012). DELLA interaguju sa transkripcionim faktorima iz grupe "*ETHYLENE RESPONSE FACTOR*", koji indukuju biosintezu etilena (Marín-de la Rosa *et al.*, 2014). DELLA takođe promovišu i akumulaciju ABA, koja antagonizuje GA efekte (Zentella *et al.*, 2007). Kod biljaka koje imaju razvijenu adaptaciju za prevazilaženje submergentnih uslova, usled pada parcijalnog pritiska kiseonika dolazi do nagomilavanja etilena i pada endogene količine ABA (Ram *et al.*, 2002; Vierzen *et al.*, 2003; Voeselek *et al.*, 2003; Benchop *et al.*, 2005). Kao posledica toga dolazi do pojačane sinteze GA i povećanja osetljivosti tkiva prema GA (Vierzen *et al.*, 2003; Voeselek *et al.*, 2003; Pieric *et al.*, 2005). Ovo se objašnjava činjenicom da ABA blokira aktivnost GA3-ox koja je direktno zadužena za sintezu GA<sub>1</sub>. Jasmonska kiselina inhibira biosintezu GA (Heinrich *et al.*, 2013) i indukuje ekspresiju DELLA, koji je uključen u signalni put jasmonske kiseline (Wild *et al.*, 2012). S druge strane, DELLA moduliraju delovanje

jasmonske kiseline interagujući sa represorom (Song *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014). Osim toga, represor iz signalnog puta jasmonske kiseline inhibira interakciju DELLA i PIF3, što objašnjava negativan efekat jasmonata na rastenje (Yang *et al.*, 2012).

### 1.2.7. Prostorna i vremenska distribucija giberelina

Prostorna i vremenska regulacija akumulacije bioaktivnih GA je od izuzetnog značaja za rastenje i razviće biljnog organizma i odvija se na više nivoa (Claeys *et al.*, 2014). GA se sintetišu u mladim organima biljke i to je prvi nivo regulacije rasteња biljnog organizma (Hedden & Thomas, 2012). Specifična lokalizacija GA takođe utiče na njihovu funkciju. Bioaktivni GA se akumuliraju u endodermisu u zoni izduživanja korena visoko regulisanim procesom, čiji mehanizam još uvek nije poznat (Ubeda-Tomás *et al.*, 2008, 2009; Shani *et al.*, 2013). Na nivo GA utiče ekspanzija ćelija u zoni izduživanja korena, usled koje dolazi do pasivne dilucije i smanjenja koncentracije GA u ćeliji (Band *et al.*, 2012; Nelissen *et al.*, 2012). Međutim, u kasnijim istraživanjima je fluorescentnim obeležavanjem bioaktivnih GA utvrđena akumulacija GA u vakuolama ćelija endoderma, što bi omogućilo kontrolu nivoa GA u citoplazmi i nukleusu, mada mehanizmi akumulacije i kontrole nivoa GA u ćeliji nisu poznati (Shani *et al.*, 2013).

DELLA direktno indukuju ekspresiju gena za biosintezu GA (*GA20-ox*, *GA3-ox*) i GA receptora (*GID1a* i *GID1b*), u svim testiranim organima, izolovanih sa biljaka arabidopsisa gajenih u mraku ili na svetlosti i na različitim stadijuma razvića (Zentella *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2008; Gallego-Bartolomé *et al.*, 2011). Promene u ekspresiji *GA2-ox* pod uticajem DELLA nije detektovana. Osetljivost prema GA takođe može biti modulirana uticajem na ekspresiju receptora GA, koja je pod uticajem cirkadijalnog ritma (Arana *et al.*, 2011) i DELLA (Zentella *et al.*, 2007).

Posttranslaciona modifikacija čini DELLA represore stabilnijim i otpornijim prema degradaciji i uvodi još jedan nivo regulacije procesa u kojima DELLA učestvuju (Wang *et al.*, 2009; Filardo *et al.*, 2009). DELLA sadrže Ser/Thr/Val domen, kao pogodno mesto za fosforilaciju ili N-acetilglukozaminaciju (Dai & Xue, 2010). Ser/Thr kinaza, koju kod pirinča kodira gen "*EARLY FLOWERING1*" (*ELI*) vrši fosforilaciju DELLA (Dai & Xue, 2010), dok O-GlcNAc transferaza, koju kodira gen "*SPINDLY*" (*SPY*), vrši

N-acetilglukozaminaciju DELLA (Filardo *et al.*, 2009). EL1 i SPY povećavaju otpornost DELLA prema degradaciji indukovanoj GA i predstavljaju represore signalnog puta GA (Filardo *et al.*, 2009; Dai & Xue, 2010).

DELLA proteini arabidopsisa se tkivno-specifično eksprimiraju i imaju specijalizovane funkcije u nekim fiziološkim procesima (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2010). DELLA regulišu aktivnost transkripcionih faktora i drugih regulatornih proteina, kao što su remodelatori hromatina, npr. PKL (Sarnowska *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014). Remodelovanje hromatina značajno utiče na ekspresiju gena. U vezi s tim, uočena je korelacija između brze promene nivoa transkripta PHYA i promena u specifičnoj modifikaciji histona (Jang *et al.*, 2011).

Negativni regulatori, kao PIL5, suprimiraju ekspresiju *GA3-ox1* i *GA3-ox2* i indukuju ekspresiju *GA2-ox* i u prisustvu PHYA i PHYB, čime pokreću katabolizam GA (Penfield *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2006).

Kao što je već rečeno, na metabolizam GA značajno utiču faktori iz okruženja. Većina faktora sredine koji izlaze iz okvira optimalnog za rastenje i razviće, inhibira rastenje biljaka. U najvećem broju slučajeva usporavanje rasteња biljnog organizma se vrši smanjenjem nivoa bioaktivnih GA indukcijom katabolizma GA, odnosno indukcijom ekspresije *GA2-ox* (Magome *et al.*, 2008; Suo *et al.*, 2012; Claeys & Inzé, 2013). To je slučaj sa povećanim salinitetom (Achard *et al.*, 2006), skraćanjem dužine dana (Eriksson & Moritz, 2002; Mølmann *et al.*, 2005), niskom temperaturom (Achard *et al.*, 2008). Za razliku od uticaja na rastenje biljaka, hladni tretman stimuliše klijanje semena indukcijom ekspresije *GA20-ox* i *GA3-ox* i inhibicijom ekspresije *GA2-ox* (Penfield *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007).

Ekspresija *GID1*, *DELLA*, *PIF4* i *PIF5* je pod kontrolom cirkadijalnog oscilatora (Yamashino *et al.*, 2003; Nozue *et al.*, 2007; Arana *et al.*, 2011). Nivo *GID1* iRNK je nizak u zoru, dok je nivo *DELLA* najniži noću, počinje da raste u zoru i najveći je u toku dana (Arana *et al.*, 2011). Nivo proteina *PIF4* i *PIF5* je najveći na kraju noći (Nozue *et al.*, 2007). Svi *PIF* interaguju sa komponentama centralnog oscilatora (Yamashino *et al.*, 2003). Ekspresija *GA20-ox* je takođe pod kontrolom cirkadijalnog oscilatora (Jackson *et al.*, 2000; Hisamatsu *et al.*, 2005; Stavang *et al.*, 2005; Paparelli *et al.*, 2013).

U skladu s tim, Hauvermale *et al.* (2012) su predložili modifikaciju modela Feng *et al.* (2008), po kojoj DELLA inhibiraju PIF u zoru. Nivo PIF4 je najveći pred zoru, GID1 opada u zoru, zbog čega raste nivo DELLA i represija PIF4, sve dok se odnos R i FR svetlosti ne poveća dovoljno za potpunu degradaciju PIF4.

### 1.2.8. Uticaj giberelina na proliferaciju, ekspanziju i diferencijaciju ćelija

GA kontrolišu proliferaciju i ekspanziju ćelija (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009; Claeys *et al.*, 2012; Nelissen *et al.*, 2012). Međutim, efekat GA je specifičan za vrstu, biljni organ, tkivo, pa čak i za određeni tip ćelija u tkivu (Gonzalez *et al.*, 2010; Claeys *et al.*, 2014). GA imaju različite funkcije u različitim organima iste biljne vrste, npr. GA različito deluju na SAM i apikalni meristem korena (eng. Root Apical Meristem - RAM) (Sakamoto *et al.*, 2001; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009); u listu kukuruza GA kontrolišu i proliferaciju i ekspanziju ćelija, dok u internodijama i hipokotilu stimulišu samo ekspanziju ćelija (Nelissen *et al.*, 2012).

GA stimuliše ćelijsku deobu i proliferaciju ćelija indukcijom ekspresije ključnih gena ćelijskog ciklusa, za cikline i ciklin-zavisne kinaze (Fabian *et al.*, 2000) ili ukidanjem represije koju vrše DELLA na regulatore transkripcije ciklin-zavisnih kinaza (Lee *et al.*, 2012).

GA kontrolišu veličinu meristema korena i regulišu rastenje korena arabidopsisa stimulacijom proliferacije meristemskih ćelija endoderma (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). Nasuprot tome, za održavanje kontrolisanog nivoa ćelijskih deoba u SAM potrebno je redukovati nivo GA (Sakamoto *et al.*, 2001). GA se eliminiše iz SAM inhibicijom ekspresije *GA20-ox* i povećanjem ekspresije *GA2-ox* na granici prve primordije lista (Sakamoto *et al.*, 2001). U skladu s tim, inhibitorni efekat GA na formiranje lateralnih korenova se može objasniti činjenicom da je za inicijaciju lateralnih korenova potrebna dediferencijacija ćelije ksilemskog pericikla i njen ponovni ulazak u ćelijski ciklus, a taj proces je favorizovan pri nižoj koncentraciji GA (Gou *et al.*, 2010).

GA su najpoznatiji po stimulaciji izduživanja ćelija u endodermu zone izduživanja korena, hipokotilu, stablu, listu itd. GA sintetisan u meristemskim ćelijama korteksa i epidermisa korena se transportuje u endodermis, gde utiče na izduživanje ćelija

(Ubeda-Tomás *et al.*, 2008). Tokom rastenja i razvića lista, nivo GA<sub>1</sub> i GA<sub>4</sub> raste u bazalnom delu lista kukuruza tokom proliferacije. Međutim, kad nivo GA<sub>1</sub> i GA<sub>4</sub> dostigne prag, prestaju ćelijske deobe i počinje ekspanzija ćelija (Nelissen *et al.*, 2012). Maksimalno GA<sub>1</sub> i GA<sub>4</sub> na granici zone deoba i zone ekspanzije se održava zahvaljujući lokalnom katabolizmu GA i diluciji GA do koje dolazi usled ekspanzije ćelija (Nelissen *et al.*, 2012). Povećan nivo GA<sub>1</sub> kod transformisanih biljaka sa povećanom ekspresijom *GA20-ox* odlaže dostizanje praga kad deobe prelaze u ekspanziju i zbog toga je list ovih biljaka duži (Nelissen *et al.*, 2012).

GA stimuliše prelazak sa programa razvića meristema na organogenezu pupoljaka (Galinha *et al.*, 2009) i *de novo* organogenezu pupoljaka (Nikolić *et al.*, 2010). Osim toga, GA koordinišu procese koji su povezani sa rasteњem, kao što je deoba i biogeneza hloroplasta (Jiang *et al.*, 2012) i povezivanje primarnog metabolizma sa rasteњem (Ribeiro *et al.*, 2012).

### 1.3. Spanać (*Spinacia oleracea* L.)

Spanać (*Spinacia oleracea* L.) pripada familiji *Chenopodiaceae*. Potiče iz srednje-istočne Azije. Prirodno je rasprostranjen od Avganistana do istočnog dela Mediterana (Kondo *et al.*, 1991). Prvi put je kultivisan od strane Arapa, koji su ga preneli u severnu Afriku, a zatim u Španiju, odakle se dalje širio (Al-Khayri, 1997). Već od 1806. godine semena spanaća se komercijalno prodaju u SAD-u, mada se smatra da je u Ameriku donet mnogo ranije (Al-Khayri, 1997). Tokom dugotrajnog perioda kultivacije spanaća selekcionisan je veliki broj sorti, koje se razlikuju po obliku semena, teksturi i boji listova, obliku i dužini petiola (Nešković & Čulafić, 1988). U ponudi domaćih proizvođača semena nalazi se samo sorta "Matador".

Spanać je jednogodišnja kultura; uzgaja se radi listova, koji se koriste u ishrani ljudi. Korenov sistem se razvija do dubine 15 do 30 cm, a stabljika dostiže visinu do 30 cm (Pavlek *et al.*, 1982). Ne toleriše visoke temperature i kiselu podlogu. Tokom vegetativne faze razvića formira rozetu, dok se reproduktivna faza odlikuje izduživanjem i grananjem. To je biljka kratke vegetativne sezone koja se propagira semenima – terofita (Al-Khayri, 1997).

Spanać je izuzetno bogat azotnim jedinjenjima, od kojih 77% čine proteini, 4% aminokiseline i 19% druga jedinjenja (Schuphan *et al.*, 1967). Biljke spanaća su jedan od najbogatijih izvora vitamina A i K. Spanać obiluje filokinonom (368 mg/100 g sveže pripremljenog spanaća) koji je najčešći oblik vitamina K u biljkama (Yasin *et al.*, 2013, 2014). Značajno je pomenuti i skoro potpuno odsustvo holesterola u sirovom spanaću, kao i visok sadržaj folata i gvožđa. Međutim, negativan aspekt korišćenja spanaća u ishrani je njegov visok sadržaj nitrata (preko 3000 mg/kg), koji je posebno visok u petiolama (Nešković & Čulafić, 1988) i oksalata (Goto *et al.*, 1996). Odavno je poznata činjenica da pravilna ishrana sprečava pojavu i razvoj hroničnih bolesti, koje izaziva oksidativni stres u ljudskom telu. U tom smislu, spanać se pokazao kao izuzetno zdrava hrana. Po sadržaju ukupnih fenola spanać zauzima drugo mesto, odmah nakon brokolija, a po antioksidativnom kapacitetu, spanać je na četvrtom mestu od 10 najzastupljenijih vrsta povrća u ljudskoj ishrani, iza crvene paprike, brokolija i šargarepe (Chu *et al.*, 2002). Od sveg testiranog povrća, spanać je pokazao najveći inhibitoryni efekat na proliferaciju HepG<sub>2</sub> ćelija kancera jetre ljudi (Chu *et al.*, 2002).

### 1.3.1. Regeneracija spanaća *in vitro*

Morfogenezu spanaća *in vitro* su prvi put opisali Nešković i Radojević (1973) kod sorte "Matador". Posle pauze od skoro dve decenije, tokom kojih je spanać smatran reklacitrantnom vrstom, usledio je niz publikacija. U kratkom vremenskom periodu je postignuta regeneracija skoro svim procesima regeneracije: mikropropagacijom (Kondo *et al.*, 1991), kaulogenezom (Al-Khayri *et al.*, 1991a; Molvig & Rose, 1994; Xiao & Branchard, 1995; Knoll *et al.*, 1997; Geekyanage *et al.*, 2006) i somatskom embriogenezom (Xiao & Branchard, 1993; Komai *et al.*, 1995, 1996a; Zdravković-Korać & Nešković, 1998, 1999). U većini navedenih slučajeva regeneracija je bila indirektna. Direktna regeneracija adventivnih pupoljaka je indukovana iz epidermalnih i subepidermalnih ćelija korena (Knoll *et al.*, 1997) i bazalnog dela kotiledona (Geekyanage *et al.*, 2006), a direktna regeneracija somatskih embriona je indukovana iz listova biljaka gajenih *in vitro*, mada je ova pojava bila relativno retka (Zdravković-Korać & Nešković, 1998). Osim toga, kod spanaća je uočena i istovremena regeneracija pupoljaka i somatskih



embriona iz kalusa indukovanih iz listova biljaka gajenih *ex vitro* (Zdravković-Korać & Nešković, 1999). Za indukciju regeneracije spanaća su korišćene i tehnike suspenzije ćelija (Xiao *et al.*, 1997), protoplasta (Goto *et al.*, 1996; Komai *et al.*, 1996a) i TCL (Leguillon *et al.*, 2003).

### 1.3.2. Faktori koji utiču na regeneraciju spanaća *in vitro*

#### Genotip

Uticao genotipa na regenerativni potencijal spanaća *in vitro* je studiran poređenjem regenerativnog potencijala sorti. Međutim, poređenje rezultata dobijenih u različitim studijama nije moguće, jer su autori koristili različite procedure za indukciju regeneracije. I pored toga, uočena je velika varijabilnost regenerativnog potencijala sorti spanaća, pa većina autora ističe genetički faktor kao ključan za efikasnost regeneracije. Poređenje potencijala za formiranje adventivnih pupoljaka iz listova klijanaca četiri sorte spanaća je pokazalo da su se sorte međusobno razlikovale ne samo u kaulogenom, već i u kalogenom kapacitetu (Al-Khayri *et al.*, 1991a). I kod sorti dostupnih na našem tržištu, "Matador" i "Viroflay", utvrđena je razlika u regenerativnom potencijalu, 3.7% odnosno 5.7% (Zdravković-Korać & Nešković, 1999).

Jedina studija u kojoj je regenerativni potencijal spanaća proučavan na individualnom nivou je studija Ishizaki *et al.* (2001). Autori su pokazali veliku varijabilnost frekvence regeneracije somatskih embriona iz odsečaka korenova nasumično izabranih jedinki sorte "Nippon", koja se kretala u opsegu od 0% do oko 80%.

#### Regulatori rasteња

Za indukciju kalusa iz različitih tipova eksplantata su korišćeni brojni auksini. Najefikasniji auksin za indukciju kaulogenog kalusa iz odsečaka listova spanaća je bio 2,4-D, pri čemu je najveća frekvencija formiranja kalusa postignuta pri koncentraciji od 0.5 mg/l. Drugi auksini IAA, NAA i *para*-hlorfenoksisirćetna kiselina (*p*CPA) su indukovali formiranje kalusa koji kasnije nije imao regenerativni kapacitet (Al-Khayri *et al.*, 1991a, b, c, d; Al-Khayri, 1997). Međutim, u drugim studijama kaulogeni kalus je uspešno indukovano iz različitih tipova eksplantata pomoću IAA i 5.6-Cl<sub>2</sub>-IAA (Nešković & Radojević, 1973; Mii *et al.*, 1987,

1992; Xiao & Branchard, 1995). U većini navedenih studija KIN je uticao na povećanje efikasnosti produkcije kalusa (Nešković & Radojević, 1973; Al-Khayri *et al.*, 1992b; Xiao & Branchard, 1993; Al-Khayri 1997).

GA<sub>3</sub> se kao neophodan sastojak medijuma za indukciju regeneracije pupoljaka navodi od strane gotovo svih autora (Al-Khayri *et al.*, 1991a,b,c,d, 1992a; Molvig & Rose, 1994; Knoll *et al.*, 1997). Molvig i Rose (1994) smatraju da auksini indukuju dediferencijaciju ćelija, dok GA<sub>3</sub> stimulišu razviće primordija. Xiao i Branchard (1995) su istakli mogućnost da GA<sub>3</sub> represijom proliferacije kalusa stimuliše formiranje pupoljaka. Citokinini su poželjni u medijumu za regeneraciju, ali ne i neophodni (Molvig & Rose, 1994), mada su u nekim studijama imali čak i inhibitorni efekat (Komai *et al.*, 1996b; Knoll *et al.*, 1997). Ožiljavanje regenerisanih pupoljaka je bilo efikasno na medijumu sa IBA, IAA ili NAA, dok je 2,4-D inhibirao ovaj proces (Al-Khayri, 1997).

Za indukciju embriogenog kalusa iz odsečaka hipokotila, Xiao i Branchard (1993) su koristili visoke koncentracije IAA (8.5-15 mg/l) i GA<sub>3</sub> (3.46-34.64 mg/l). Kalus indukovan na odsečcima listova i hipokotila na medijumu sa 4.4 μM (1 mg/l) 2,4-D i 4.6 μM (1 mg/l) KIN, je posle subkultivacije na medijum sa 4.6 μM KIN regenerisao SE, dok je u slučaju subkultivacije na medijum bez BRR regenerisao pupoljke (Zdravković-Korać & Nešković, 1998). Dodatak 4 μM ABA je izazvao dramatično povećanje broja somatskih embriona, verovatno delujući stresno na tkivo (Zdravković-Korać & Nešković, 1999). Ipak, pri ovoj koncentraciji ABA većina somatskih embriona je bila zaustavljena na globularnom stadijumu razvića. Ista studija je pokazala da je i GA<sub>3</sub> u koncentracijama 0.3-10 μM inhibirao konverziju globularnih somatskih embriona u bipolarne forme. Nasuprot tome, dalje razviće globularnih somatskih embriona je bilo stimulirano u prisustvu IAA i 1 μM ABA (Zdravković-Korać & Nešković, 1999).

Komai *et al.* (1996b) su za indukciju embriogenog kalusa iz odsečaka korenova testirali veliki broj auksina (IBA, IAA, NAA i 2,4-D). Iako su svi testirani auksini indukovali pojavu kalusa, ni jedan od njih nije bio dovoljan da indukuje kompetenciju ćelija za somatsku embriogenezu. U kombinaciji sa različitim citokininima postignuta je vrlo niska frekvencija formiranja somatskih embriona. Međutim, uključivanje GA<sub>3</sub> u medijum za indukciju kalusa je dovelo do dramatičnog povećanja embriogenog kapaciteta

kalusa (Komai *et al.*, 1996b), a najbolji rezultati su postignuti kombinacijom 10  $\mu\text{M}$  NAA i 0.1  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> (Komai *et al.*, 1996a; Ishizaki *et al.*, 2001). Zanimljivo je da su za direktnu regeneraciju pupoljaka iz odsečaka korenova spanaća Knoll *et al.* (1997) koristili sličnu kombinaciju BRR, 20  $\mu\text{M}$  NAA i 5  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>. Iz izloženih rezultata je očigledno da je GA<sub>3</sub> od izuzetnog značaja za indukciju kaulogeneze i somatske embriogeneze spanaća.

### Tip eksplantata

Za indukciju regeneracije spanaća korišćeni su organi klijanaca (odsecci kotiledona, hipokotila, korenčića i prvih listova) ili adultnih biljaka (odsecci listova i odsecci korenova biljaka gajenih *in vitro*). U uporednim studijama došlo se do zaključka da je indukcija regeneracije bila najefikasnija iz korenova (Xiao & Branchard, 1995; Komai *et al.*, 1996a; Knoll *et al.*, 1997). Osim toga, na efikasnost regeneracije je uticao i subfragment eksplantata iz kojeg se indukuje regeneracija. Apikalni fragmenti lateralnih korenova su pokazali značajno veći regenerativni kapacitet od srednjih, a posebno od bazalnih odsečaka (Knoll *et al.*, 1997). Bazalni fragmenti kotiledona klijanaca spanaća su imali regenerativni kapacitet, za razliku od distalnih fragmenata (Komai *et al.*, 1996a).

Starost eksplantata takođe značajno utiče na regenerativni kapacitet. Činjenica da mlado tkivo pokazuje veći regenerativni kapacitet od starijeg je razlog što se za indukciju regeneracije najčešće koriste organi klijanaca (Al-Khayri, 1997). U skladu s tim, kotiledoni mladih klijanaca su imali vaći kaulogeni kapacitet od starijih (Zhang & Zeevaart, 1999).

### Mineralni rastvor

Na regenerativni potencijal spanaća značajno utiče ukupna količina neorganskog azota u medijumu i odnos nitrata i amonijuma. Regeneracija somatskih embriona iz odsečaka korenova sorte "Jiromaru" je bila najefikasnija kad je medijum sadržao Nitsch (1969) ili MS/2 mineralni rastvor (Komai *et al.*, 1996a). Ukupna koncentracija neorganskog azota u ovim mineralnim rastvorima iznosi oko 30 mM, a odnos nitrata i amonijuma je približno 2:1. Regenerativni kapacitet je bio značajno manji na medijumu sa MS, B5 (Gamborg *et al.*, 1968) ili SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) mineralnim rastvorima, koji sadrže višestruko veću količinu nitrata nego amonijuma, a na medijumu sa White mineralnim

rastvorom (White, 1943), koji sadrži samo nisku koncentraciju nitrata, regeneracije nije bilo.

### Fizički faktori

Iako su Al-Khayri *et al.* (1991a) pokazali da je indukcija kalusa spanaća efikasnija u mraku, i da kalusi indukovani u mraku, po subkultivaciji na medijum za regeneraciju, pokazuju veći regenerativni potencijal od kalusa indukovanih na svetlosti, u skoro svim ostalim studijama eksplantati su sve vreme gajeni na svetlosti, u uslovima DD (Komai *et al.* 1996a; Knoll *et al.*, 1997; Zdravković-Korać & Nešković, 1999; Ishizaki *et al.*, 2001) ili KD (Zhang & Zeevaart, 1999; Chin *et al.*, 2009) i pri gustini fluksa fotona svetlosti 16-90  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . U većini studija kulture su gajene na 20-25°C. Međutim, novija istraživanja su pokazala da je frekvencija regeneracije pupoljaka iz kalusa spanaća bila bar 5 puta veća na 14°C nego na 25°C (Chin *et al.*, 2009).

#### **1.3.3. Ekspresija pola spanaća**

Spanać je dominantno diecka biljka, ali su u prirodnim populacijama prisutne i monecke biljke (Onodera *et al.*, 2011). Kod sorte "Matador" ima svega 5-15% moneckih biljaka (Ćulafić & Nešković, 1980). Diploidne ćelije spanaća imaju  $n=12$  hromozoma. Janick & Steveenson (1955) su postavili hipotezu po kojoj pol spanaća determiniše jedan lokus sa tri alela (Y, X i  $X^m$ ). Biljke sa XX kombinacijom alela su ženske,  $X^mY$  i XY muške, dok su  $X^mX^m$  i  $X^mX$  monecke. Mapiranjem hromozoma spanaća je pokazano da su ovi aleli locirani na najdužem, šestom hromozomu (Onodera *et al.*, 2011). Ipak, najskorija istraživanja ukazuju da se aleli za monecizam i diecizam nalaze na različitim lokusima (Yamamoto *et al.*, 2014). Odnos polova je u prirodnim uslovima približan, ali se može promeniti delovanjem različitih faktora (Deng *et al.*, 2013). Smatra se da biljke spanaća imaju potencijal da razviju cvetove oba pola, ali da je jedan pol kod dieckih biljaka suprimiran i da se nivo supresije može smanjiti pod nekim uslovima, kao što je zračenje, povišena temperatura ili kultivisanje *in vitro* (Komai *et al.*, 2003). Chailakhyan i Khryanin (1979) su pokazali maskulinizirajući efekat GA i feminizirajući efekat citokina na ekspresiju pola spanaća. Kako je spanać biljka dugog dana, mladi listovi apikalnog

pupoljka u uslovima *in vitro*, su sposobni da prime fotoperiodsku indukciju i da u uslovima DD cvetaju u visokom procentu. Egzogeni GA<sub>3</sub> i povećavanje temperature su indukovali cvetanje spanaća i u uslovima KD (Ćulafić, 1973; Ćulafić & Nešković, 1980).

Al-Khayri *et al.* (1992a) su prvi pokazali nestabilnost ekspresije pola spanaća *in vitro*. Ženski pol se stabilno ekspimirao kod regeneranata dobijenih iz ženskih donor-biljka, dok su regeneranti dobijeni iz muških donor-biljaka u 9-20% slučajeva postajali andromonecki. Komai *et al.* (1999) su u drugom ciklusu regeneracije (kada su regeneranti donori korenova za regeneraciju) uočili pojavu ginomonecizma kod prethodno ženskih biljaka. U trećem ciklusu kod 43% andromoneckih biljaka je došlo do reverzije u muški pol, dok se ginomonecke biljke nisu revertovale u ženske biljke (Komai & Masuda, 2004). Iako ni u jednom slučaju nije bilo promene muškog u ženski pol i obrnuto, autori su zaključili da oba pola imaju potencijal da obrazuju oba tipa cvetova. Eksperimenti vezani za ovu problematiku su značajni sa ekonomskog aspekta, ako se ima u vidu da ženske biljke proizvode veću lisnu masu od muških biljaka (Pavlek *et al.*, 1982).

#### 1.4. Ribozom inaktivirajući proteini - RIP

Ribozom inaktivirajući proteini (RIP) spadaju u grupu citotoksičnih N-glikozidaza, koji raskidaju N-C veze između adenina i pentoznih šećera i specifično uklanjaju adenin iz konzervisanog regiona ribozomalne RNK (rRNK). Modulacija adeninskog ostatka blokira vezivanje elongacionog faktora 1 i 2 za ribozom i na taj način ireverzibilno inhibira translaciju (Willy *et al.*, 2001; Kawade & Masuda, 2009). Dugo se smatralo da je rRNK jedini supstrat na koji ovi proteini deluju, ali je kasnije pokazano da iRNK i DNK mogu biti supstrat RIP (Kumari & Kumar, 2011). Većina autora RIP deli, na osnovu broja polipeptidnih lanaca kojih ih čine, na dve grupe. Opciono postoji i treća grupa, mada postoji i mišljenje da su ovi proteini samo podgrupa prve (Stripe, 2005).

RIP tip1 su monomerni enzimi sa molekulskom masom od 30 kDa. Najpoznatiji protein iz ove kategorije je saporin iz *Saponaria officinalis* (Kumari & Kumar, 2011). RIP tipa 1 najčešće sintetišu biljke iz familija *Cucurbitaceae*, *Caryophyllaceae* i *Euphorbiaceae* (Stripe 2004).

RIP tip2 su heteromerični enzimi sa dva različita polipeptida obeležena kao A lanac (N-glikozidaza) i B lanac (lektin vezujuća aktivnost). Molekulska masa svakog lanca je oko 30 kDa. Smatra se da su RIP iz ove grupe potentniji toksini u odnosu na RIP prve grupe (Stripe, 2005). Napoznatiji primeri su ricin izolovan iz *Ricinus communis* i abrin izolovan iz *Arbus precatorius* (Olsnes, 2004).

RIP tip 3 čine jedini do sada identifikovani proteini JIP60 iz ječma i b-32 iz kukuruza (Stripe, 2005). JIP60 je sličan RIP tipu 1, ali ima još jedan segment slične veličine, ali nepoznate funkcije. Molekulska masa ovog proteina iznosi 60 kDa (Reinbothe *et al.*, 1994). b-32 kukuruza se sintetiše kao proenzim, a postaje aktivan tek nakon uklanjanja internog peptidnog segmenta (Walsh *et al.*, 1991).

RIP su široko rasprostranjeni u prirodi, ali su dominantno prisutni u biljkama, bakterijama i gljivama (Nielsen & Boston, 2001). Mogu biti prisutni u svim biljnim organima, ali su najčešće prisutni u semenima (Stirpe *et al.*, 1983). RIP do sada nisu otkriveni kod arabidopsisa što u mnogome otežava razvijanje efikasnog sistema za njihovo izučavanje (Peumans *et al.*, 2001). Primarna uloga RIP u biljkama nije do kraja razjašnjena. Pretpostavlja se da imaju odbrambenu ulogu i ulogu u programiranoj senescenciji (Hartley *et al.*, 1996; Peumans *et al.*, 2001; Stripe & Batelli, 2006). Takođe, njihovu ekspresiju mogu indukovati mehanički ili osmotski stres, kao i hormoni stresa ABA i jasmonska kiselina (Reinbothe *et al.*, 1994; Rippmann *et al.*, 1997; Chhikara *et al.*, 2012). Smatra se da u terminalnim fazama odgovora na stres, u kojima dolazi do prekida većine metaboličkih funkcija, RIP deluju na sopstvene ribosome, što vodi ka programiranoj ćelijskoj smrti (Reinbothe *et al.*, 1994). Osim toga, uočen je diurnalni ritam u ekspresiji ovih gena, sa maksimumom na sredini svetlog dela dana (Rippmann *et al.*, 1997). Ekspimiranje ovih gena u transgenim biljkama dovelo je do povećane otpornost ovih biljaka prema patogenim organizmima (Chhikara *et al.*, 2012). Međutim, uočeno je da se ovi proteini mogu i konstitutivno ekspimirati na niskom nivou pod optimalnim uslovima, bez prisutnih stresora. Pokazano je da je ekspresija nekih RIP regulisana razvojnim stadijumom biljke. Cinamomin, tip 2 RIP izolovan iz *Cinamomum camphora*, se sintetiše u kotiledonima da bi se rapidno degradovao tokom klijanja (Liu *et al.*, 2002). *Phytolacca americana* sintetiše tri RIP: PAP, PAP-2 i PAP-S. Od toga geni za PAP i PAP-2 se ekspimiraju u listovima

tokom proleća i leta, dok se PAP-S eksprimira samo u semenima (Irvin, 1983; Irvin & Uckun, 1992).

Citotoksičnost RIP proteina je vrlo varijabilna. Ribozomi biljaka koje sintetišu RIP su osetljivi na njih, tako da su oni uvek fizički razdvojeni izuzev u slučaju RIP tipa 3, koji se sintetišu kao proenzimi (Hartley *et al.*, 1996). Zbog visoke toksičnosti RIP tipa 2 se sintetišu kao preproteini. Uklanjanjem signalnog peptida sa N-terminusa prekursornog molekula preproricina nastaje proricin (Lord, 1985). Preproricin se sintetiše u endoplazmatičnom retikulumu, a zatim se Goldžijevim kompleksom upućuje u vakuolu. Tek u vakuoli nastaje zreli ricin, kako ne bi delovao na sopstvene ribozome. Osim u vakuoli, RIP proteini mogu biti lokalizovani u matriksu ćelijskog zida, kao PAP-H, izolovan iz korenova *Phytolacca americana* (Park *et al.*, 2002). Zanimljivo je da prečišćen PAP-H nije imao antifungalno dejstvo, ali je eksudat korena koji je sadržao PAP-H, hitinazu,  $\beta$ -1,3-glukanazu i proteazu bio delotvoran protiv gljiva koje žive u zemljištu (Park *et al.*, 2002). PAP-H je detektovan u ostacima ćelija korenove kape i to je verovatno način kojim se u prirodnim uslovima oslobađa u rizosferu. Etilen indukuje oslobađanje PAP-H u rizosferu, ali ne i njegovu produkciju u ćeliji (Park *et al.*, 2002). Pretpostavlja se da se RIP proteini lokalizovani u citoplazmi ili vakuoli oslobađaju lizom ćelija pri napadu patogena (Nielsen & Boston, 2001).

Interesovanje za RIP je poslednjih godina poraslo zbog njihovog snažnog citotoksičnog delovanja na tumorske ćelije. Razvijanjem monoklonskih antitela protiv specifičnih markera tumor ćelija i njihovom fuzijom sa RIP moguća je specifična eliminacija ćelija tumora (De Virgilio *et al.*, 2010).

#### **1.4.1. Ribozom inaktivirajući proteini spanaća**

Iz embriogenog kalusa spanaća su izolovana 2 najzastupljenija proteina koja nisu bila prisutna u neembriogenom kalusu (Ishizaki *et al.*, 2002; Kawade *et al.*, 2008). Analizom aminokiselinske sekvence, ovi proteini su svrstani u RIP proteine i nazvani su SoRIP1, odnosno SoRIP2. Oba proteina imaju konzervisan shiga/ricin toksični domen, karakterističan za RIP proteine i N-glikozidaznu aktivnost (Ishizaki *et al.*, 2002). Nivo homologije SoRIP1 i SoRIP2 je nizak (35%), kao i nivo njihove homologije sa drugim

poznatim predstavnicima RIP. SoRIP1 je najbliži rip-r1, a SoRIP2 betavulginu, proteinima izolovanim iz šećerne repe (Kawade & Masuda, 2009). Gen *SoRIP1* kodira sekvenca od 1555 bp, sa dva egzona i intronom od 598 bp, a gen *SoRIP2* sekvenca od 834 bp bez introna (Kawade & Masuda, 2009).

Detaljna analiza ekspresije *SoRIP1* i *SoRIP2* je izvršena poređenjem njihove ekspresije u embriogenim kalusima, koji su gajeni 25 dana na medijumu za indukciju kalusa sa 10  $\mu$ M NAA + 0.1  $\mu$ M GA<sub>3</sub>, i neembriogenim kalusima, gajenim na medijumu sa 10  $\mu$ M NAA bez GA<sub>3</sub> (Kawade *et al.*, 2008). Tokom ovog tretmana pokazano je da je *SoRIP1* bio eksprimiran na niskom nivou u korenovima, neembriogenim kalusima i embriogenim kalusima tokom prvih 18 dana, dok je snažna ekspresija detektovana u embriogenim kalusima tek na kraju indukcionog tretmana (25. dana). *SoRIP1* se eksprimirao i u embriogenom kalusu nepromenjenim intenzitetom tokom sledeće 4 nedelje kultivacije na medijumu bez BRR, kao i u izolovanim somatskim embrionima. Nivo ekspresije *SoRIP2* je bio izuzetno nizak u korenovima pre indukcionog tretmana, kao i u neembriogenim kalusima i embriogenim kalusima sve do 3. nedelje posle subkultivisanja na medijum bez BRR, da bi snažna ekspresija bila detektovana tek u 4. nedelji na ovom medijumu. U somatskim embrionima je takođe detektovan visok nivo ekspresije *SoRIP2*.

Histohemijskom analizom je pokazano prisustvo SoRIP1 u embriogenom kalusu, posebno na periferiji kalusa, gde su uočene grupacije proembriona, dok je u neembriogenom kalusu nivo SoRIP1 bio vrlo nizak. SoRIP2 nije detektovan u značajnoj količini ni u embriogenom ni u neembriogenom kalusima. U globularnim i srololikim somatskim embrionima SoRIP1 je bio prisutan u oblasti meristema, dok je u torpedo embrionima SoRIP1 bio lokalizovan u ćelijama epidermisa. SoRIP2 je bio lokalizovan u ćelijama epidermisa na svim stadijumima razvića somatskih embriona (Kawade *et al.*, 2008).

U vegetativnim organima, *SoRIP1* se značajno eksprimirao u nezrelim plodovima i korenovima spanaća, manje u cvetovima i značajno manje u listovima, dok se *SoRIP2* najznačajnije eksprimirao u cvetovima i samo neznatno u nezrelim plodovima i listovima (Kawade & Masuda, 2009). Ekspresija *SoRIP1* i *SoRIP2* nije detektovana u zrelih semenima spanaća. Nivo ekspresije *SoRIP1* je opadao tokom razvića plodova, dok je



ekspresija *SoRIP2* bila vrlo slaba i konstantna tokom razvića plodova. *SoRIP1* je bio lokalizovan u perifernim regionima nezrelog zigotskog embriona i samo neznatno u unutrašnjosti embriona, a *SoRIP2* se akumulirao u epidermisu zigotskih embriona (Kawade & Masuda, 2009).

Analiza regulatornih sekvenci ovih gena je pokazala 70 poznatih promotorskih motiva za *SoRIP1* i 83 za *SoRIP2* (Kawade & Masuda, 2009). Osim standardnih CAAT i TATA elemenata, detektovani su *cis* elementi uključeni u kontrolu razvića, cirkadijalnog ritma, odgovora na svetlosni signal i biotički i abiotički stres. U uzvodnom regionu *SoRIP1* je detektovan RY motiv, koji predstavlja vezujuće mesto homeodomen proteina WUS tipa, napin motivi, koji su povezani sa embriogenezom i elementi koje indukuje etilen, a koji su u vezi sa sazrevanjem plodova (Kawade & Masuda, 2009). U promotoru *SoRIP2* su prisutni regulatorni elementi vezani za odbrambene funkcije, kao i elementi koje indukuje ABA, homologe vezujućim mestima embrion faktora 1 i 3 iz soje sa funkcijom ekspresije gena za rezervne proteine (Kawade & Masuda, 2009).

Dodatak ABA, u medijum za regeneraciju somatskih embriona nije uticao na indukciju ekspresije ni jednog *SoRIP* gena (Kawade *et al.*, 2008). Salicilna kiselina, koja indukuje ekspresiju gena koji učestvuju u odbrani organizma od patogena, je indukovala ekspresiju *SoRIP2*, ali ne i ekspresiju *SoRIP1* (Kawade & Masuda, 2009).

S obzirom da je RY motiv vezujuće mesto LEC2 i FUSCA3 (FUS3) transkripcionih faktora i lokalizacija ekspresije *SoRIP1* umnogome podseća na ekspresiju FUS3, kao i da WUS ima značajnu ulogu u najranijoj fazi somatske embriogeneze, genu *SoRIP1* je pripisana uloga u razviću embriona (Kawade & Masuda, 2009), dok je genu *SoRIP2* pripisana odbrambena uloga.

## 2. CILJEVI RADA

- Jedan od glavnih ciljeva ovog rada bilo je utvrđivanje uzroka izuzetno niskog regenerativnog potencijala spanaća sorte "Matador". Realizacija ovog cilja izvršena je sprovođenjem nekoliko eksperimentalnih zadataka:
  1. Određivanje regenerativnog potencijala korenova izolovanih sa individualnih klijanaca spanaća nasumično izabranih iz populacije.
  2. Praćenje regenerativnog potencijala potomstva tih linija dobijenog samoukrštanjem *in vitro*.
  3. Poređenje regenerativnog potencijala korena klijanca i korenova izolovanih sa biljaka razvijenih iz somatskih embriona (SE).
  
- Naredni cilj je bila optimizacija uslova za što efikasniju regeneraciju SE iz apikalnih odsečaka lateralnih korenova spanaća. Testiran je uticaj:
  4. Fotoperioda
  5. Gustine fluksa fotona svetlosti
  6. Egzogenih giberelina
  7. Higromicina
  
- U cilju razvijanja model-sistema za brzu i preciznu procenu embriogenog potencijala korenova spanaća urađeni su sledeći eksperimenti:
  8. Praćenje ekspresije potencijalnih marker-gena u tkivu koje ne regeneriše SE i u SE na različitim stadijumima razvića.
  9. Procena podobnosti odabranog marker-gena *SoRIP2* za selekciju linija sa visokim regenerativnim potencijalom.
  10. Procena upotrebljivosti marker-gena u testiranju uticaja sredinskih faktora na somatsku embriogenezu.

- Kako bi se objasnila uloga i interakcija svetlosti i giberelina u promociji somatske embriogeneze kod spanaća, praćen je:
  11. Uticaj fotoperioda na ekspresiju gena za metabolizam giberelina: *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1*.
  12. Uticaj egzogenih giberelina na ekspresiju *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1*.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Biljni materijal

##### 3.1.1. Uspostavljanje *in vitro* kulture spanaća

U svim eksperimentima su korišćena semena spanaća (*Spinacia oleracea* L.) sorte "Matador" (NS Seme, Novi Sad, Srbija). Semena su površinski sterilisana ispiranjem tekućom vodom tokom 10 min, uz dodatak nekoliko kapi komercijalnog deterdženta (Fairy, Procter & Gamble, Ohio, USA), a zatim inkubiranjem 30 min u 30% rastvoru varikine (4% NaClO, Panonija, Pančevo, Srbija) uz konstantno mućkanje na horizontalnoj mešalici (85 rpm). Procedura sterilizacije je ponovljena sa 15% rastvorom varikine u trajanju od 15 min. Semena su zatim tri puta isprana sterilnom dejonizovanom vodom, osušena na sterilnom filter papiru i postavljena u petri kutije (20 semena po petri kutiji prečnika 90 mm) na bazalni medijum bez dodatih BRR. Semena su isključavana u mraku ili na svetlosti u zavisnosti od potrebe eksperimenta.

Nakon 7 dana, klijanci su prebaćeni na svež medijum (tri klijanca po petri kutiji), kako bi imali prostora da razviju korenov sistem. Klijanci su gajeni naredne 2-3 nedelje u istim uslovima u kojima su isključavani. Za eksperimente su korišćeni klijanci na stadijumu razvića sa 4-5 listova i dobro razvijenim korenovim sistemom.

##### 3.1.2. Bazalni medijum za gajenje spanaća

Bazalni medijum je sadržao MS makro i mikro elemente (Lachner, Brno, Czech Republic) po recepturi Murashige & Skoog (1962), uz dodatak, 20 g/l saharoze, 100 mg/l myo-inozitola, 2 mg/l tiamina, 2 mg/l piridoksina, 5 mg/l nikotinske kiseline i 2 mg/l adenina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Za geliranje medijuma je korišćen agar (Institut za virusologiju, vakcine i serume Torlak, Beograd, Srbija) u koncentraciji 7 g/l. Pre dodavanja agara pH medijuma je podešavan na 5.6 uz pomoć pH-metra (Consort C860, Turnhout, Belgium). Medijum je sterilisan na 114°C i 80 kPa tokom 25 min u autoklavu (Raypa® AE75, Barcelona, Spain).

### 3.1.3. Uslovi gajenja *in vitro* kultura spanaća

Kulture su gajene na temperaturi  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , na svetlosti fluorescentnih lampi (Philips, Amsterdam, Netherlands), pri gustini fluksa fotona (PPFD) od oko  $70 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ , izmerenog instrumentom LI-1400 DataLogger sa LI-190SA quantum senzorom (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Germany), u uslovima dugog dana (DD, 16 h svetlosti) ili kratkog dana (KD, 8 h svetlosti), izuzev eksperimenata u kojima je intenzitet svetlosti variran, što je naznačeno naknadno.

## 3.2. Testiranje regenerativnog potencijala korenova spanaća

### 3.2.1. Procedura za indukciju regeneracije iz odsečaka korenova

U svim eksperimentima regeneracija je indukovana iz apikalnih fragmenata lateralnih korenova spanaća dužine 1 cm, prema modifikovanoj proceduri Knoll *et al.* (1997). Eksplantati su postavljeni u petri kutije sa čvrstim medijumom za indukciju regeneracije, koji je sadržavao  $20 \mu\text{M}$  NAA (Sigma-Aldrich) i  $5 \mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich). GA<sub>3</sub> je rastvoren u apsolutnom etanolu, sterilisan filter-sterilizacijom ( $0.22 \mu\text{m}$ , Merck Millipore, Billerica, MA, USA) i dodavan u sterilisan medijum ohlađen na oko  $40^\circ\text{C}$ .

Eksplantati su subkultivisani na medijum istog sastava u intervalima od 4 nedelje, tokom perioda od 12 nedelja. Pre svake subkulture sa eksplantata su uklanjani regeneranti, te je kvantifikacija, koja je podrazumevala brojanje SE uz pomoć stereomikroskopa (Carl Zeiss, Jena, Germany) na kraju svake subkulture, predstavljala broj primarnih regeneranata. Kulture su nasumično poređane na polici u svim eksperimentima (eng. Completely Randomized Design - CRD).

### 3.2.2. Uspostavljanje kolekcije genotipova i analiza njihovog regenerativnog potencijala

Indukciji regeneracije je podvrgnuto 30 klijanaca nasumično odabranih iz populacije označenih kao parentalni (P) klijanci. Apikalni izdanci izolovani sa P klijanaca su gajeni u epruvetama (jedan izdanak po epruveti) sa 10 ml bazalnog medijuma bez BRR u uslovima DD tokom perioda od 12 nedelja. Fragmenti korenova i apikalni izdanci koji

potiču sa istog klijanca su obeleženi istim brojem. Biljke koje su se razvile iz apikalnih izdanaka su se samooprašile i dale semena, koja su prikupljena u aseptičnim uslovima i postavljena na isključavanje na bazalni medijum bez BRR. Semena su zatim podvrgnuta hlađenju na 7°C u trajanju od 2 nedelje, a zatim su gajena u uslovima DD do razvića klijanca. Ovi klijanci su obeleženi kao S<sub>1</sub> generacija. Svaki klijanac je obeležen oznakom parentalnog genotipa i jedinstvenim rednim brojem. Na isti način, samooprašivanjem S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, i S<sub>3</sub> biljaka su dobijeni klijanci S<sub>2</sub>, odnosno S<sub>3</sub> i S<sub>4</sub> generacije. Korenovi ovih klijanaca su služili za indukciju regeneracije na isti način kao i korenovi P klijanaca. Analiziran je regenerativni potencijal 23 S<sub>1</sub>, 23 S<sub>2</sub>, 17 S<sub>3</sub> i 5 S<sub>4</sub> klijanaca. Klijanac i svi regeneranti dobijeni iz njegovih korenova su označeni kao linija ili genotip.

Sa svakog klijanca je izolovano 30 odsečaka korenova i postavljeno u 6 petri kutija sa po 5 odsečaka (n=30).

#### **3.2.3. Poređenje regenerativnog potencijala korenova klijanaca i regeneranata**

Regenerativni potencijal korenova klijanaca je upoređen sa regenerativnim potencijalom korenova regeneranata dobijenih iz istog klijanca. Fragmenti korenova regeneranata su podvrgnuti indukciji regeneracije na isti način kao i fragmenti korenova klijanaca.

SE izolovani sa fragmenata korenova su nakon procesa kvantifikacije prebačeni na bazalni medijum sa dodatkom 5 µM 6-furfurilaminopurina (kinetin, KIN – Sigma-Aldrich). Na ovom medijumu SE su se razvili u zdrave biljke (u daljem tekstu regeneranti), koje su se ožiljavale i umnožavale, što je predstavljalo stalni izvor materijala za održavanje kontinuiteta eksperimenata. Regeneranti su gajeni u uslovima KD, kako bi se sprečilo cvetanje i završetak vegetativnog perioda. Za testiranje regenerativnog potencijala regeneranata, biljke koje su bile izabrane za eksperiment su prethodno gajene 4 nedelje u uslovima DD. Neke od ovih biljaka su se samooprašile, a dobijena semena su označena po gore opisanom principu.

Za svaku liniju su postavljene po 4 petri kutije sa po 5 fragmenata korenova izolovanih sa regeneranata i eksperiment je ponovljen 2 puta (n=40). Fragmenti korenova izolovani sa klijanaca su postavljeni kako je opisano pod 3.2.2.

#### **3.2.4. Uticaj fotoperioda i intenziteta svetlosti na regenerativni potencijal**

Uticaj fotoperioda na regenerativni potencijal spanaća je testiran na 40 nasumično izabranih klijanaca. Apikalni fragmenti lateralnih korenova (1 cm) istog klijanca su izolovani i u jednakom broju postavljeni u uslove KD i DD. Indukcija regeneracije je vršena prema gore opisanom protokolu za indukciju regeneracije. Za oba fotoperioda su postavljene po 4 Petri kutije prečnika 50 mm, sa po 5 fragmenata korenova (n=20). Kvantifikacija SE je vršena uz pomoć steromikroskopa na svake 4 nedelje, tokom perioda od 12 nedelja. Nakon kvantifikacije SE su uklanjani i podvrgavani multiplikaciji i ožiljavanju kao što je ranije opisano. Petri kutije u uslovima oba fotoperioda su bile izložene identičnom intenzitetu svetlosti.

Za ispitivanje uticaja intenziteta svetlosti (PPFD) na regenerativni potencijal spanaća, korišćeni su fragmenti korenova regeneranata. Odabrana su tri genotipa (110, 125 i 148) koji su u prethodnim eksperimentima pokazali dobar regenerativni potencijal. Fragmenti korenova su bili izloženi PPFD od: 5, 50, 100 i 150  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$  u uslovima DD ili gajeni u mraku tokom perioda od 12 nedelja. Eksplantati su tokom ovog perioda gajeni na medijumu za indukciju regeneracije. Za svaki tretman su postavljene 4 Petri kutije sa po 5 fragmenata korenova (n=20).

#### **3.2.5. Uticaj egzogenih giberelina i prisustva svetlosti na regenerativni potencijal**

Testirana je mogućnost određenih genotipova da regenerišu na bazalnom medijumu (u odsustvu giberelina, a uz dodatak 20  $\mu\text{M}$  NAA) u uslovima DD. Testirano je devet linija: 238-6-3-1-1, 238-6-3-1, 110, 125, 147, 148, 152, 155 i 156. Analiziran je i uticaj giberelina  $\text{GA}_1$  i  $\text{GA}_3$ , dodatih u bazalni medijum koji je sadržao i 20  $\mu\text{M}$  NAA, na indukciju regeneracije iz apikalnih odsečaka korenova spanaća.  $\text{GA}_1$  je dobijen ljubaznošću dr Slađane Todorović, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", i dr R.P. Pharis,

University of Calgary, Canada). Za svaki giberelin je postavljen trofaktorijalni eksperiment u kome su testirani sledeći faktori: koncentracija giberelina (0, 2.5, 5, 7.5, 10  $\mu\text{M}$ ), genotip (regeneranti linija 125 i 238-6-3-1) i svetlost (DD i mrak). U uslovima DD sve kulture su bile izložene identičnom intenzitetu svetlosti (100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ ). Ukupan uzorak za svaki tretman je bio 3 petri kutije sa po 5 fragmenata korenova ( $n=15$ ).

#### 3.2.6. Uticaj higromicina na regenerativni potencijal

Uticaj higromicina (eng. hygromycin, hyg – Sigma-Aldrich) na indukciju regeneracije SE iz apikalnih fragmenata korenova spanaća je testiran na liniji 238-6-3-1, sa izuzetno dobrim regenerativnim potencijalom, koji je dobijen nakon 3 ciklusa samooprašivanja *in vitro*. Fragmenti korenova su gajeni jednu nedelju na medijumu za indukciju regeneracije bez hyg, a zatim su subkultivisani na medijum istog sastava sa: 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 ili 10 mg/l hyg. Rastvor hyg je sterilisan filtriranjem (0.22  $\mu\text{m}$ , Merck Millipore) i dodavan u autoklaviran medijum ohlađen na oko 40°C, pod aseptičnim uslovima. Za svaki tretman su postavljene po 4 petri kutije sa po 20 fragmenata korenova ( $n=80$ ). SE su prebrojani uz pomoć stereomikroskopa nakon 4 nedelje gajenja na medijumu sa hyg.

Uticaj hyg na razviće SE i pojavu sekundarnih somatskih embriona (SSE) je praćen tako što su SE (3-5 mm), izolovani sa fragmenata korenova gajenih na medijumu za indukciju regeneracije bez hyg, postavljeni na medijum sa: 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 ili 20 mg/l hyg. Za svaki tretman postavljene su po 3 petri kutije sa po 15 eksplantata ( $n=45$ ). Broj SSE po primarnom SE, kao i broj nekrotičnih eksplantata zabeležen je nakon 4 nedelje uz pomoć stereomikroskopa.

Tokom oba eksperimenta kulture su gajene u uslovima DD pri identičnom PPFĐ od 80  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ .

#### 3.2.7. Statistička analiza podataka koji se odnose na regenerativni potencijal

Uticaj svih testiranih faktora na indukciju regeneracije iz korenova spanaća je opisan sledećim veličinama: frekvencom regeneracije (određenom kao procenat eksplantata koji regenerišu), prosečnim brojem SE po eksplantatu i indeksom koji opisuje potencijal za



formiranje embriona (PFE). PFE je izvedena veličina koja objedinjuje frekvencu regeneracije i prosečan broj SE po eksplantatu, izračunata po formuli:

$$\text{PFE} = (\text{prosečan broj SE po eksplantatu}) \times (\text{procenat eksplantata koji regenerišu}) / 100$$

Za sekundarnu somatsku embriogenezu je korišćena izvedena veličina - potencijal za formiranje sekundarnih somatskih embriona (PFSSE), koja je izračunata po istoj formuli kao i PFE. PFE i PFSSE indeksi su računati po petri kutiji, podaci su zatim podvrgnuti transformaciji kvadratnim korenovanjem i analizirani.

Procentualni podaci su pre analize podvrgnuti angularnoj transformaciji ( $\arcsin\sqrt{X}$ ), dok su podaci za broj SE transformisani kvadratnim korenovanjem. Statistička značajnost između tretmana je testirana standardnom analizom varijanse (ANOVA). Razlike između 4 grupe linija (5, 9, 18 i 238) su testirane pomoću "nested" ANOVA. Svaku grupu je činila P linija i njeni potomci. Pri "nested" analizi faktor "linija" je bio ugnježđen ("nested") u faktor "grupa". Srednje vrednosti u svim analizama su razdvajane uz pomoć Fisherovog LSD *post-hoc* testa ( $p \leq 0.05$ ). Uticaj fotoperioda (KD i DD) i razlika embriogenog potencijala između klijanaca i regeneranata je testirana pomoću t-testa za zavisne uzorke.

Nakon analize dobijeni rezultati su transformisani odgovarajućim inverznim funkcijama i kao takvi prikazani.

### **3.3. Analiza ekspresije gena potencijalnih markera somatske embriogeneze i gena uključenih u metabolizam giberelina spanaća**

#### **3.3.1. Analiza ekspresije gena**

##### **3.3.1.1. Izolacija ukupnih RNK**

Za analizu ekspresije gena potencijalnih markera somatske embriogeneze i gena uključenih u metabolizam giberelina, korišćeni su apikalni fragmenti lateralnih korenova spanaća. Ukupna RNK je izolovana po modifikovanom protokolu Gašić *et al.* (2004):

- 150 mg biljnog tkiva je homogenizovano u avanu u tečnom azotu.

- U uzorke je dodato po 650  $\mu$ l ekstrakcionog pufera (Tabela 1) i 15  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoetanol.
- Uzorci su vorteksovani i zatim inkubirani 15 min u vodenom kupatilu na 60°C.
- U svaki uzorak je dodato 650  $\mu$ l smeše hloroform:izoamil alkohol (24:1).
- Uzorci su zatim centrifugirani 10 min na 10000 x g na 4°C.
- Ekstrakcija hloroformom i izoamil alkoholom je ponovljena.
- U supernatant (oko 600  $\mu$ l) je dodato 166  $\mu$ l 7.5 M LiCl i uzorci su inkubirani na 4°C preko noći.
- Narednog dana uzorci su centrifugirani 45 min na 12000 x g na 4°C.
- Supernatant je odbačen, pelet je ispran sa 1 ml 70% etanola i uzorci su centrifugirani 10 min na 12000 x g na 4°C.
- Supernatant je odbačen i pelet osušen tokom 5 min u laminarnoj komori.
- Pelet je zatim rastvoren u 100  $\mu$ l vode i dodato je 10  $\mu$ l Na-acetata (pH 5.5) i 275  $\mu$ l 70% etanola.
- Uzorci su inkubirani minimum jedan sat na -70°C, a zatim su centrifugirani 45 min na 12000 x g na 4°C.
- Supernatant je odbačen i pelet ispran etanolom, kao što je prethodno opisano.
- RNK je osušena u laminarnoj komori (ne duže od 10 min), rastvorena u 50  $\mu$ l vode i do upotrebe čuvana na -70°C.

**Tabela 1** – Satav pufera za ekstrakciju RNK (Gašić *et al.*, 2004).

2 x CTAB ekstrakcioni pufer	Finalne koncentracije
CTAB	2% (w/v)
PVP K-30 solubilni	2% (w/v)
TRIS – HCl pH 8	100 mM
EDTA	25 mM
NaCl	2 M
spermidin	0.5 g/l
H <sub>2</sub> O (DEPC pretretirana)	

### 3. Materijal i metode

Kvantitet i kvalitet izolata dobijene RNK su proveravani spektrofotometrijski i elektroforezom na agaroznom gelu. Koncentracija ukupnih RNK je određena po formuli:

$$c(\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \times 100;$$

gde je  $A_{260}$  – apsorbanca RNK na 260 nm,  $40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  – koncentracija jednolančane RNK pri  $A_{260} = 1$  i 100 – faktor razblaženja.

Čistoća izolovanih RNK je procenjena na osnovu odnosa  $A_{260}/A_{280}$  koji se za čiste izolate RNK kreće u intervalu 1.8 i 2.2. Integritet RNK je određen elektroforetskim razdvajanjem  $1 \mu\text{g}$  uzorka RNK na 1.2% (w/v) agaroznom gelu.

Izolovana RNK je tretirana DNK-azom (DNase I, Thermo Scientific, Waltham, MA USA) kako bi se eliminisala eventualno zaostala genomska DNK (Tabela 2). Tretman je trajao 30 min na  $37^\circ\text{C}$ . Stopiranje DNK-aze je izvršeno dodavanjem  $1 \mu\text{l}$  etilen diamin tetra sirćetne kiseline (EDTA - Thermo Scientific) u svaki izolat i inkubiranjem 10 min na  $65^\circ\text{C}$ .

**Tabela 2** – Sastav reakcione smeše za eliminaciju DNK u uzorcima RNK

Komponenta	Po reakciji (10 $\mu\text{l}$ )	Finalna koncentracija
10 x DNase I pufer	1 $\mu\text{l}$	
DNase I (1 U/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$	0.1 U/ $\mu\text{l}$
RNase inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0.25 $\mu\text{l}$	1 U/ $\mu\text{l}$
RNK (1 $\mu\text{g}$ )	max 6.75 $\mu\text{l}$	
H <sub>2</sub> O	do 9 $\mu\text{l}$	

**3.3.1.2. Reverzna transkripcija (RT) RNK molekula**

RNK je prevedena u komplementarne jednolančane DNK (cDNK) molekule reakcijama reverzne transkripcije (RT). Za RT reakciju korišćen je GeneAmp<sup>®</sup> Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a sastav reakcionih smeša dat je u Tabeli 3. U svaku RT reakciju je unošeno 200 ng ukupnih RNK.

**Tabela 3** – Sastav reakcione smeše za reverznu transkripciju

Komponenta	Po reakciji (20 µl )	Finalna koncentracija
H <sub>2</sub> O	6.7 µl	
5 x RT pufer	4 µl	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µl	2.5 mM
dNTP (10 mM)	2 µl	1 mM
DTT (100 mM)	2 µl	10 mM
oligo-dT (50 µM)	0.5 µl	1.25 mM
RNase inhibitor (20 U/µl)	0.5 µl	0.5 U/µl
MultiScribe <sup>®</sup> transcriptase (50 U/µl)	0.3 µl	0.75 U/µl
RNK (0.1 µg/µl)	2 µl	0.01 µg/µl

RT reakcija se odvijala u dva koraka, na 25°C tokom 10 min i zatim na 42°C tokom 12 min.

**3.3.1.3. Reakcija lančanog umnožavanja (PCR)**

Dobijeni cDNK molekuli su zatim umnožavani pomoću gen-specifičnih prajmera u reakciji lančanog umnožavanja (eng. Polymerase Chain Reaction; PCR). Sve PCR reakcije zapremine 25 µl postavljene su korišćenjem AmpliTaq Gold<sup>®</sup> PCR Kit (Applied Biosystems) po recepturi datoj u Tabeli 4.

**Tabela 4** – Sastav reakcione smeše za PCR

Komponenta	Po reakciji (25 $\mu$ l)	Finalna koncentracija
H <sub>2</sub> O	9 $\mu$ l	
10 x PCR pufer	1.5 $\mu$ l	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0.75 $\mu$ l	0.75 mM
dNTP (10 mM)	1 $\mu$ l	0.4 mM
Forward (F) prajmer (5 $\mu$ M)	1.25 $\mu$ l	0.25 $\mu$ M
Reverse (R) prajmer (5 $\mu$ M)	1.25 $\mu$ l	0.25 $\mu$ M
Taq polimeraza (5 U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ l	0.05 U/ $\mu$ l
cDNK	10 $\mu$ l	

Program za PCR umnožavanje je sadržavao inicijalnu denaturaciju na 95°C u trajanju od 5 min, zatim 36 ciklusa denaturacije (95°C, 1 min), vezivanja prajmera (60°C, 1 min) i elongacije (72°C, 1 min), kao i finalnu elongaciju na 72°C tokom 10 min. Temperatura vezivanja svih korišćenih prajmera je bila ista (60°C). RT i PCR reakcije su se odvijale u mašini Mastercycler® nexus Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany).

#### **3.3.1.4. Određivanje nivoa ekspresije gena metodom kvantitativnog RT-PCR (qRT-PCR)**

Nivo ekspresije analiziranih gena je određivan metodom kvantitativnog RT-PCR (qRT-PCR), korišćenjem Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix-a (Thermo Scientific) u mašini ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). U reakcione smeše zapremine 25  $\mu$ l (Tabela 5) unošeno je po 2.5  $\mu$ l odgovarajuće cDNK. Ova cDNK dobijena je po prethodno opisanom protokolu reverznom transkripcijom 200 ng ukupnih RNK. Za svaki gen postavljana je kontrola bez cDNK (eng. Non Template Control-NTC), koja je umesto cDNK sadržala 2.5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Da bi bila eliminisana mogućnost pojave pozitivnog signala usled prisustva i umnožavanja genomske DNK, na svaku ploču je postavljana negativna RT kontrola, smeša za RT-PCR bez reverzne transkriptaze.

Tabela 5 – Sastav reakcione smeše za qRT-PCR

Komponenta	Po reakciji (25 µl)	Finalna koncentracija
H <sub>2</sub> O	7 µl	
SYBR Master Mix	12.5 µl	
F prajmer (5 µM)	1.5 µl	0.3 µM
R prajmer (5 µM)	1.5 µl	0.3 µM
cDNK/standard	2.5 µl	

Radi provere efikasnosti qRT-PCR reakcija za svaki od analiziranih gena su napravljene standardne krive. Standardi korišćeni u analizi ekspresije *SoRIP2* gena predstavljali su razblaženja cDNK (5x, 10x, 100x i 1000x) uzorka koji je nakon RT-PCR dao najintenzivniji signal. U analizi ekspresije gena uključenih u metabolizam GA standardi su predstavljali seriju razblaženja odgovarajuće cDNK ( $10^7$  - 10 kopija/µl) umnožene u PCR reakciji korišćenjem specifičnih prajmera i njenim izolovanjem sa 1.2% (w/v) agaroznog gela uz pomoć kita GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) po uputstvu proizvođača. Broj kopija specifičnog produkta po µl je određen uz pomoć programa <http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>.

Svi uzorci su nanošeni na ploču u triplikatima. Nivo ekspresije ciljanih gena određivan je korišćenjem  $\Delta\Delta C_t$  metode (Livak & Schmittgen, 2001). Kao endogena kontrola u svim eksperimentima, tj. gen sa konstitutivnom ekspresijom, korišćen je  *$\alpha$ -tubulin* arabidopsisa (GenBank™ pristupni br. M21414.1; Kawade & Masuda, 2009), umnožavan specifičnim prajmerima prikazanim u Tabeli 6. Uzorak u odnosu na koga je predstavljana promena ekspresije (kalibrator) i kome je dodeljivana vrednost 1, posebno je naznačen u svakom opisanom eksperimentu.

**Tabela 6** – Sekvence prajmera za amplifikaciju gena za  $\alpha$ -tubulin

Naziv prajmera	Sekvenca (5'-3')	Dužina amplikona (bp)	Izvor
F: $\alpha$ - tubulin	ACCCTCGGATCCACTTCATG	585	Kawade &
R: $\alpha$ - tubulin	AGGGCAGCAAGATCCTCACG		Masuda, 2009

F- forward, R-reverse

Na osnovu dobijenih prosečnih  $C_t$  vrednosti triplikata uzoraka, kalibratora i endogene kontrole izračunata je razlika u ekspresiji na sledeći način:

$$\Delta\Delta C_t = [(C_{t \text{ uzorka}} - C_{t \text{ eku}}) - (C_{t \text{ kal}} - C_{t \text{ ekk}})]$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$C_{t \text{ uzorka}}$  = prosečna  $C_t$  vrednost uzorka dobijena korišćenjem prajmera za gen od interesa

$C_{t \text{ eku}}$  = prosečna  $C_t$  vrednost uzorka dobijana korišćenjem prajmera za endogenu kontrolu

$C_{t \text{ kal}}$  = prosečna  $C_t$  vrednost za kalibrator dobijena korišćenjem prajmera za gen od interesa

$C_{t \text{ ekk}}$  = prosečna  $C_t$  vrednost za kalibrator dobijana korišćenjem prajmera za endogenu kontrolu

R – odnos ekspresije uzorka u odnosu na kalibrator

### 3.3.2. Uspostavljanje model-sistema za praćenje somatske embriogeneze spanaća molekularnim markerima

#### 3.3.2.1. Odabir pouzdanog molekularnog markera za praćenje somatske embriogeneze

Ekspresija gena za RIP spanaća (Kawade *et al.*, 2008) analizirana je metodama RT-PCR i qRT-PCR. Za testiranje *SoRIP1* (*Spinacia oleracea* RIP1, GenBank™ pristupni

br. AB435548, Kawade & Masuda, 2009) i *SoRIP2* (*Spinacia oleracea* RIP2, GenBank™ pristupni br. AB435547.1, Kawade & Masuda, 2009) gena korišćeni su prajmeri prikazani u Tabeli 7. Osim prajmera preuzetih iz Kawade & Masuda (2009) za amplifikaciju *SoRIP1* gena dizajnirani su i drugi prajmeri korišćenjem Primer-BLAST softverskog alata ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast); Ye *et al.*, 2012). Temperatura vezivanja prajmera je optimizirana i testirana u opsegu 55-67°C. Specifičnost svih korišćenih prajmera potvrđena je na dva načina, gel elektroforezom RT-PCR produkata i analizom krive topljenja posle qRT-PCR reakcije.

**Tabela 7** – Sekvence prajmera korišćene za amplifikaciju gena *SoRIP1* i *SoRIP2*

Naziv prajmera	Sekvenca (5'-3')	Dužina amplikona (bp)	Izvor
F: <i>SoRIP1</i> -J	GAAGCACACCATTACCAGGA	594	Kawade & Masuda, 2009
R: <i>SoRIP1</i> -J	CCTCTTGTCTGTACTCAGTG		
F: <i>SoRIP1</i> -I	TGCCCCCTCAAGCTGCTAAGAACAA	244	sopstveni
R: <i>SoRIP1</i> -I	CGTGCTGCCTCCGCAACCA		
F: <i>SoRIP1</i> -II	CCTCAAGCTGCTAAGAACAACC	236	sopstveni
R: <i>SoRIP1</i> -II	GCCTCCGCAACCATTGGA		
F: <i>SoRIP2</i>	ACCTTCCTAAGTGACATACG	629	Kawade & Masuda, 2009
R: <i>SoRIP2</i>	GCATATACTAACGCAATTGG		

F - forward, R - reverse

Procena podobnosti molekularnih markera izvršena je na osnovu analize ekspresije dva *SoRIP* gena u embrionima izolovanim sa apikalnih odsečaka korenova regeneranata linije 188 gajenih na medijumu za indukciju regeneracije. Tokom regeneracije sa eksplantata su uzorkovani SE na različitim stupnjevima razvića: na globularnom stupnju (zajedno sa tkivom korena), jasno uočljivi SE veličine do 2 mm, 2-5 mm i veći od 5 mm (svi odvojeni od tkiva korena). Ukupna RNK za svaki uzorak je izolovana iz SE regenerisanih sa 20 odsečaka korenova (po 5 odsečaka gajenih u 4 petri kutje). U datom eksperimentu kao kalibrator su korišćeni fragmenti korena gajeni na medijumu bez BRR.

Radi provere homologije dobijenih amplikona sa sekvencama *SoRIP1* i *SoRIP2* gena, PCR produkti umnoženi korišćenjem gen specifičnih prajmera (Tabela 7) razdvojeni



su elektroforezom na 1.2% agaroznom gelu, a zatim prečišćeni sa gela korišćenjem GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Sekvenciranje amplifikovanih produkata urađeno je u komercijalnom servisu MacroGen (Netherland; [www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

### 3.3.2.2. Utvrđivanje korelacije regenerativnog potencijala korenova kljanaca i ekspresije *SoRIP2*

Korelacija između regenerativnog potencijala korenova spanaća i ekspresije *SoRIP2* je testirana kod 10 nasumično odabranih kljanaca sa nepoznatim nivoom regenerativnog potencijala. U ekspresiji su korišćene linije: 203, 204, 228, 230, 232, 237, 240, 241, 253 i 268. Regenerativni potencijal je procenjen konvencionalnim brojanjem SE pomoću stereomikroskopa, a nivo ekspresije *SoRIP2* je testiran metodom qRT-PCR.

Apikalni fragmenti lateralnih korenova kljanaca su postavljeni na medijum za indukciju regeneracije i gajeni 4 nedelje u uslovima DD pri PPFd od 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ . Za svaku liniju je postavljeno po 5 petri kutija sa po 4 fragmenta korenova ( $n=20$ ). Nakon 4 nedelje uzorkovana je polovina ukupnog broja fragmenata korenova (svaki drugi iz petri kutije). Eksplantati su trenutno zamrznuti u tečnom azotu i do izolacije RNK čuvani na  $-70^\circ\text{C}$ . Izolacija RNK i kvantifikacija ekspresije gena *SoRIP2* metodom qRT-PCR je izvršena po opisanim procedurama. Kao kalibrator je korišćena linija 203, koja je pokazala najniži nivo ekspresije gena *SoRIP2*.

Druga polovina fragmenata korenova svake pojedinačne linije je gajena još dve subkulture (svaka po 4 nedelje) na medijumu za indukciju regeneracije. SE su kvantifikovani pomoću stereomikroskopa na 4 nedelje, tokom perioda od 12 nedelja.

### 3.3.2.3. Uticaj fotoperioda na ekspresiju *SoRIP2*

Kao biljni materijal u ovom eksperimentu korišćeni su apikalni fragmenti lateralnih korenova regeneranata tri linije spanaća kod kojih je u prethodnom eksperimentu nivo ekspresije *SoRIP2* gena, kao i PFE indeks kljanaca, okarakterisan kao nizak (228), visok (232) i prosečan (253). Eksperiment je dizajniran kao trofaktorijalni u kome su varirani sledeći parametri: genotip (228, 232 i 253), sastav medijuma (medijum za indukciju regeneracije ili medijum bez BRR) i fotoperiod (DD ili KD), pri PPFd od

100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$  za oba tretmana. Za svaku liniju je postavljeno po 5 petri kutija sa po 4 fragmenta korenova ( $n=20$ ). Nakon 4 nedelje, polovina eksplantata sa svakog tretmana (svaki drugi fragment korena iz petri kutije) je korišćena za izolaciju ukupnih RNK i dalju analizu ekspresije gena *SoRIP2* metodom qRT-PCR. Kao kalibrator za svaki pojedinačni genotip na odgovarajućem fotoperiodu korišćen je tretman bez regulatora rastenja, pošto na ovom medijumu ne dolazi do spontane regeneracije SE, te je i zabeležena najniža ekspresija *SoRIP2* gena. Druga polovina fragmenata korenova je upotrebljena za kvantifikaciju SE, koja je vršena na 4 nedelje tokom perioda od 12 nedelja.

### 3.3.3. Analiza ekspresije gena za metabolizam giberelina kod spanaća

#### 3.3.3.1. Ekspresija gena za metabolizam giberelina u izolovanim fragmentima korenova

Analizirana je ekspresija tri gena koji kodiraju ključne enzime biosintetskog puta giberelina (Lee & Zeevaart, 2002) metodama RT-PCR i qRT-PCR. To su geni spanaća za anaboličke enzime giberelin-20-oksidadazu1 (*SoGA20-ox1*, GenBank™ pristupni br. U3330 (Wu *et al.*, 1996)) i giberelin-3-oksidadazu1 (*SoGA3-ox1*, GenBank™ pristupni br. AF506280.1 (Lee & Zeevaart, 2002)), i gen za katabolički enzim giberelin-2-oksidadazu1 (*SoGA2-ox1*, GenBank™ pristupni br. AF506281.1 (Lee & Zeevaart, 2002)). Za testiranje svakog od pomenutih gena korišćeni su prajmeri (Tabela 8) dizajnirani korišćenjem Primer-BLAST softverskog alata. Temperatura vezivanja prajmera je iznosila 60°C za sva tri gena. Specifičnost svih korišćenih prajmera potvrđena je na dva načina, gel elektroforezom RT-PCR produkata i analizom krive topljenja posle qRT-PCR reakcije.

Testiranje ekspresije gena za enzime biosintetskog puta giberelina u izolovanim apikalnim fragmentima lateralnih korenova vršeno je u korenovima 7 nasumično izabranih linija regeneranata gajenih na medijumu za indukciju regeneracije tokom 4 nedelje u uslovima DD, pri PPFd od 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ . Za svaku od analiziranih linija postavljeno je po 5 eksplantata iz kojih je izolovana RNK. Eksplantati su uzorkovani 4 sata nakon paljenja svetla.

Tabela 8 – Sekvence prajmera za amplifikaciju gena *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1*

Naziv prajmera	Sekvenca (5'-3')	Dužina amplikona (bp)	Izvor
F: GA20-ox1	GCCTTGCCAAAAACCCGAAT	230	sopstveni
R: GA20-ox1	TGCTATTCACCACTGCCCTG		
F: GA3-ox1	CGGGGCTCCAAGTGTTTAGA	164	sopstveni
R: GA3-ox1	CGAGAGACGATGTTGGACCC		
F: GA2-ox1	CAATGGCGGAAGGGCTGAAT	297	sopstveni
R: GA2-ox1	GCAAAGAGTCCCCAACGAGT		

F – forward, R - reverse

### 3.3.3.2. Uticaj fotoperioda na ekspresiju *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1* gena

Analizirana je ekspresija *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1* u apikalnim fragmentima korenova spanaća izolovanih sa regeneranata linije sa prosečnim regenerativnim potencijalom (253) gajenim na medijumu bez regulatora rastenja u uslovima DD i KD. Svi eksplantati bili izloženi istom PPF od 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ . Za svaki tretman je postavljeno po 5 petri kutija sa po 4 fragmenta korenova (n=20). Eksplantati su uzorkovani 4 sata nakon paljenja svetla. Kao kalibrator su korišćeni fragmenti korenova koji su gajeni na medijumu bez BRR u mraku.

### 3.3.3.3. Uticaj egzogenih giberelina na ekspresiju *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1* gena

Uticaj egzogenih giberelina na ekspresiju *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1* gena je analiziran u apikalnim fragmentima korenova spanaća gajenim 4 nedelje na medijumu za indukciju regeneracije (NAA 20  $\mu\text{M}$  + GA<sub>3</sub> 5  $\mu\text{M}$ ) u uslovima DD i KD, pri identičnom PPF od 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ . Ekspresija gena *SoGA20-ox1* je praćena u apikalnim fargmentima korenova izolovanim sa regeneranata linije sa niskim (228), prosečnim (253) i izuzetno dobrim regenerativnim potencijalnom (232). Ekspresija druga dva gena je testirana samo kod linije 253. Kao kalibrator su korišćeni fragmenti korenova iste linije koji su gajeni na medijumu bez BRR i na istom fotoperiodu. Za svaki tretman i za svaku liniju

postavljeno je po 5 petri kutija sa po 4 fragmenta korenova (n=20). Eksplantati su uzorkovani 4 sata nakon paljenja svetla.

#### **3.3.4. Statistička analiza podataka dobijenih ispitivanjem ekspresije gena**

Prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti izračunate na osnovu tri tehnička ponavljanja. Statistička značajnost između nivoa ekspresije gena u eksplantatima gajenim na različitim tretmanima je testirana analizom varijanse (ANOVA). Srednje vrednosti u svim analizama su razdvajane uz pomoć Fisherovog LSD *post-hoc* testa ( $p \leq 0.05$ ). Statistička značajnost između ekspresije gena u eksplantatima gajenim u uslovima KD i DD je testirana pomoću t-testa za zavisne uzorke.

Stepen korelacije između PFE indeksa i nivoa ekspresije gena *SoRIP2* i *GA20-ox1* određen je Pearson-ovim korelacionim koeficijentom ( $r^2$ ).

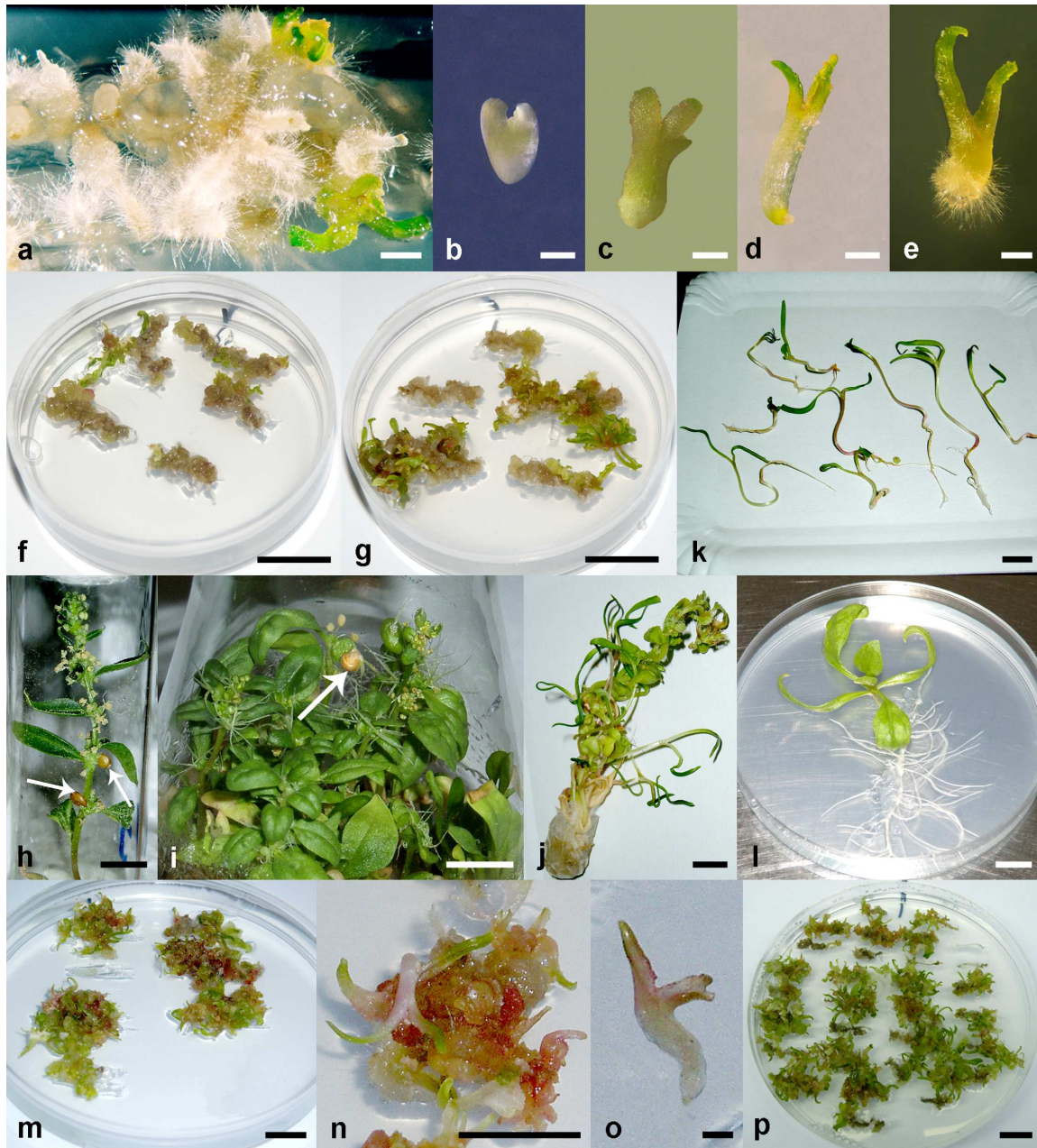
## 4. REZULTATI

### 4.1. Regenerativni potencijal spanaća

#### 4.1.1. Regenerativni potencijal P klijanaca

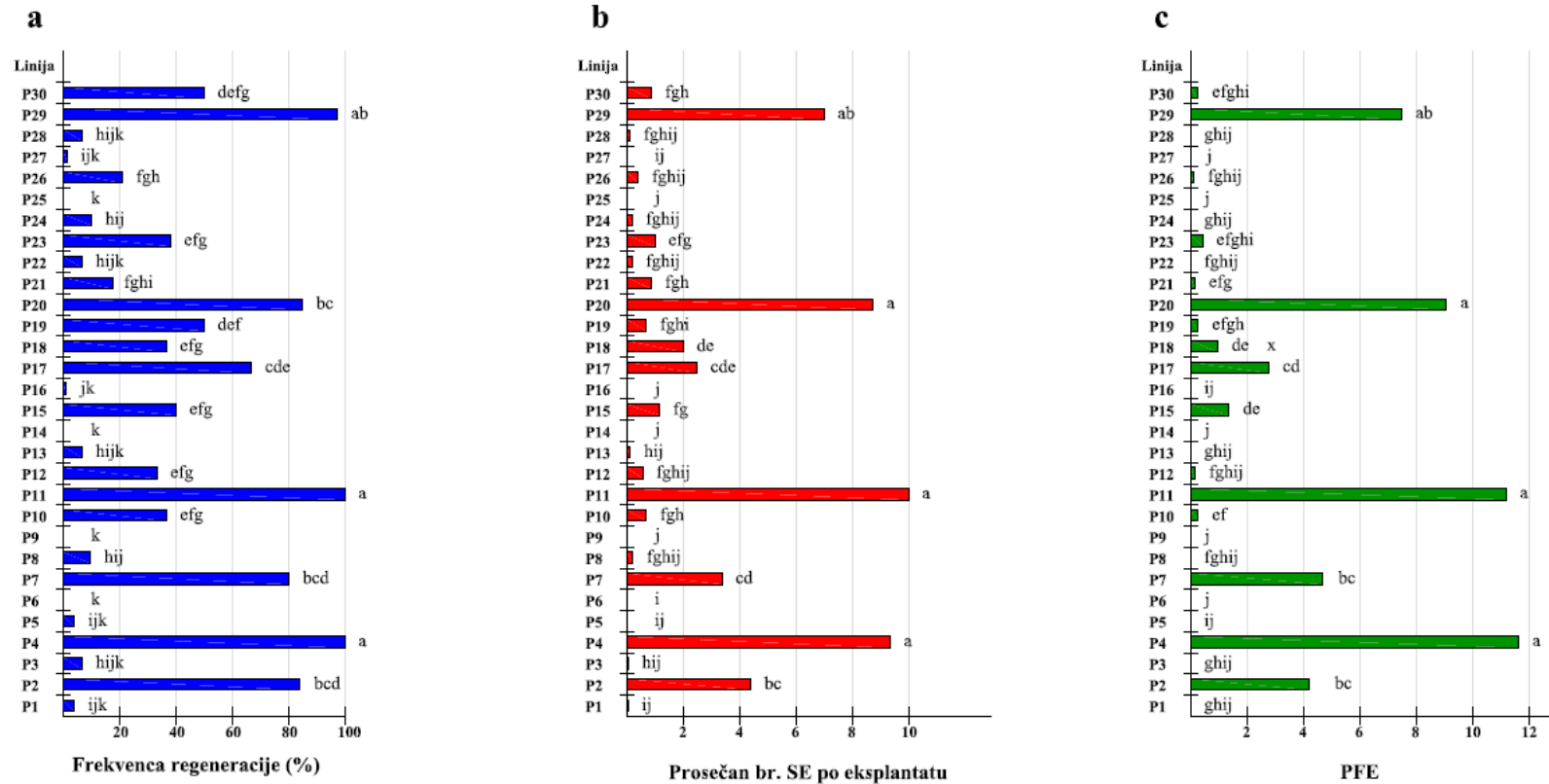
Svi fragmenti korenova gajeni na medijumu za indukciju regeneracije, počeli su da proliferišu već tokom prve nedelje u kulturi. Proliferacije su uočene duž celog korena, ali su bile ograničene i do kraja eksperimenta nije primećen voluminozni kalus ni na jednom testiranom eksplantatu (Sl. 4a). Iz proliferacija su regenerisali SE. Uočeni su SE na svim stadijumima razvića: srca, torpeda, kotiledonarnog (Sl. 4b-e), uključujući i prokljale SE (Sl. 4e). Od 30 nasumično izabranih P-klijanaca, 26 je regenerisalo sa varijabilnim embriogenim potencijalom (Sl. 4f-g) tokom perioda od 12 nedelja, dok 4 P-klijanca nisu regenerisali. Genotip (individualni klijanac) je statistički značajno uticao kako na frekvencu regeneracije ( $p \leq 0.01$ ), tako i na prosečan broj SE po eksplantatu ( $p \leq 0.0001$ ). Frekvencija regeneracije se kretala od 0.3% do 100% (Sl. 5a), dok je prosečan broj SE po eksplantatu varirao od 0.001 do 9.96 (Sl. 5b). Najveći regenerativni potencijal su imali klijanci P11, P4, P20 i P29, koji su tokom perioda od 12 nedelja regenerisali 347, 321, 298, odnosno 227 SE. Kod ovih klijanaca je zabeležena i visoka frekvencija regeneracije, kao i prosečan broj SE po eksplantatu (Sl. 5a-b). PFE indeks je kod linija koje regenerišu varirao od 0.04 do 11.81 (Sl. 5c) i za klijance P4, P11, P20 i P29 je iznosio 11.81, 11.58, 8.99, odnosno 7.22. Nažalost, ove linije nisu dale potomstvo. Fragmenti korenova nekih klijanaca su formirali veliki broj sekundarnih korenova (Sl. 4a), dok kod drugih sekundarnih korenova nije bilo (Sl. 4f).

Dinamika regeneracije, u smislu vremena pojave prvih SE, značajno se razlikovala između linija. Od 26 P-klijanaca koji su odgovorili na indukcionu tretman (Sl. 5a-c), samo je linija P18 regenerisala tokom prve subkulture, dok je 19 linija regenerisalo tokom druge, a 6 linija tek krajem treće subkulture.



**Slika 4** – Indukcija somatske embriogeneze iz apikalnih fragmenata lateralnih korenova spanaća. **(a)** Proliferacije na korenu; različiti stadijumi razvića SE: **(b)** stadijum srca, **(c)** kasni torpedo, **(d)** kotiledonarni stadijum i **(e)** proklijali SE. **(f)** Fragmenti korenova P-klijanca sa umerenim regenerativnim potencijalom i **(g)** fragmenti korenova P-klijanca sa izuzetno dobrim regenerativnim potencijalom. **(h)** Andromonecka biljka koja se razvila iz apikalnog izdanaka P-klijanca sa dva semena (strelice). **(i)** Biljke regenerisane iz SE su cvetale i dale semena. **(j)** Ginomonecka biljka koja se razvila iz apikalnog izdanka klijanca P238 sa 9 klijanaca. **(k)** Klijanci izolovani sa majke-biljke P238. **(l)** S4 klijanac na stupnju razvića sa 4 formirana lista. **(m-n)** SE dobijeni regeneracijom iz fragmenata korenova izolovanih sa klijanca 238-6-3-1-1. **(o)** SE linije 238-6-3-1-1. **(p)** Somatska embriogeneza iz fragmenata korenova biljaka koje su regenerisale iz korenova linije 238-6-3-1-1. Bar: **a-e, o** 1 mm; **f-n, p** 1 cm.

#### 4. Rezultati



**Slika 5** – Somatska embriogeneza iz apikalnih odsečaka lateralnih korenova 30 klijanaca spanaća nasumično izabranih iz populacije (P genotipovi) (a) Frekvencija regeneracije. (b) Prosečan broj SE po eksplantatu. (c) Potencijal za formiranje somatskih embriona (PFE). Kvantifikacija je izvršena posle 12 nedelja gajenja eksplantata na medijumu za indukciju regeneracije sa 20  $\mu$ M NAA + 5  $\mu$ M GA<sub>3</sub>. Podaci predstavljaju srednje vrednosti. Za svaki genotip je postavljeno po 6 Petri kutija, sa po 5 eksplantata (n=30). Vrednosti na grafiku označene istim slovom, nisu statistički značajno različite ( $p \leq 0.05$ ) prema LSD testu. Linije označene sa X na grafiku (c) počinju da regenerišu u toku prve subkulture.

#### 4.1.2. Formiranje semena *in vitro*

Apikalni izdanci P- i S-klijanaca (Sl. 4h), su se razvili u zdrave biljke, od kojih je većina cvetala. Ekspresija pola je praćena kod 240 biljaka dobijenih iz apeksa P klijanaca, korišćenih za različite eksperimente u okviru ove studije, tokom 15 nedelja. Od toga, 36.7% biljaka je ekspresiralo muški, 42.1% ženski pol, dok je 10.8% biljaka bilo monecko, a 10.4% biljaka nije cvetalo. Muške biljke P generacije su počele da cvetaju u četvrtoj, a ženske u sedmoj nedelji posle klijanja. Prva semena su se formirala u osmoj nedelji. Kod ženskih biljaka S generacije je uočeno nešto ranije cvetanje (u 5. nedelji) u odnosu na P generaciju i, u skladu s tim, i brže formiranje semena. Prva semena su uočena 6 nedelja posle klijanja.

Monecke (Sl. 4i), ginomonecke (Sl. 4j) i andromonecke (Sl. 4h) biljke su se samooprašile i dale semena (1-13 semena po biljci, u proseku  $5.14 \pm 1.68$ ) (Sl. 4h, i). Ukupno je dobijeno 117 semena (47 S<sub>1</sub>, 30 S<sub>2</sub>, 31 S<sub>3</sub> i 9 S<sub>4</sub>), pri čemu je 84 semena dobijeno sa biljka razvijenih iz apikalnog izdanka klijanaca, a 33 semena sa regeneranata. Semena su aseptično izolovana sa majke biljke i isključavana na medijumu bez BRR. Većina semena je klijala tokom hladnog tretmana (7-14 dana), dok ostala semena nisu klijala (17.09%) ili su abortivno klijala. Tokom eksperimenata je primećeno da hladan tretman nije neophodan za klijanje semena spanaća pošto je 26 semena klijalo dok su još uvek bila pričvršćena za majku biljku. Upravo je biljka razvijena iz apikalnog izdanka P238 dobar primer; od 13 semena, 9 je klijalo na majci biljci (Sl. 4j), a svi klijanci su se razvili u zdrave biljke koje su bile pogodne za dalje eksperimente (Sl. 4k). Biljka P238 je bila ginomonecka sa velikim brojem ženskih cvetova i 13 hermafroditnih cvetova. Najveći broj semena je dobijen od moneckih biljaka koje su imale približan broj muških i ženskih cvetova.

Iako je tokom ovog eksperimenta dobijeno 97 klijanaca, nisu svi bili pogodni za indukciju regeneracije. Neki klijanci nisu razvili dobar korenov sistem, pa je samo 69 klijanaca koji su na stupnju od 4-5 listova (Sl. 4l) imali dobro razvijen korenov sistem, korišćeno u daljim eksperimentima.



### 4.1.3. Regenerativni potencijal S klijanaca

Potomci P linija su pokazali varijabilan regenerativni kapacitet. P-klijanac i njegovi potomci su svrstani u jednu grupu. Studiran je regenerativni potencijal 4 grupe: 5, 9, 18 i 238. Frekvence regeneracije ( $p \leq 0.01$ ) i prosečan broj SE po eksplantatu ( $p \leq 0.01$ ) su se statistički značajno razlikovali između grupa, ali su obe veličine takođe bile statistički značajno različite ( $p \leq 0.01$  za obe) i unutar grupe.

Slično kao i roditeljske linije (Sl. 5), potomstvo klijanaca P5 i P9 je imalo izuzetno nizak regenerativni potencijal (Sl. 6). Frekvencija regeneracije nije prelazila 12% (Sl. 6a i d), a prosečan broj SE po eksplantatu nije prelazio 0.47 (Sl. 6b i e). Od 10 testiranih linija, 4 nisu odgovarale na tretman, dok se PFE indeks ostalih linija kretao od 0.09 do 0.48 (Sl. 6c i f). U okviru grupe 5, koju čine klijanac P5 i njegovo potomstvo, frekvencija regeneracije nije bila statistički značajno različita ( $p = 0.4004$ ), dok je prosečan broj SE po eksplantatu bio statistički značajno različit između linija ( $p \leq 0.05$ ). Između linija grupe 9 razlike u frekvenci regeneracije su bile statistički različite ( $p \leq 0.05$ ), kao i prosečan broj SE po eksplantatu ( $p \leq 0.0001$ ). PFE indeksi su se statistički značajno razlikovali kod grupe 5 ( $p \leq 0.05$ ) i grupe 9 ( $p \leq 0.05$ ).

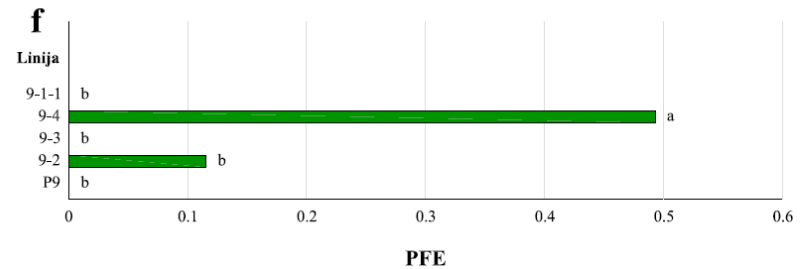
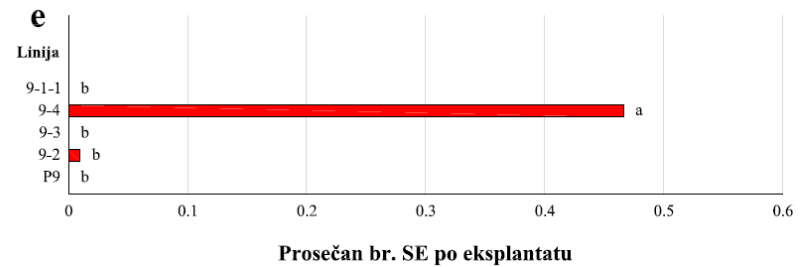
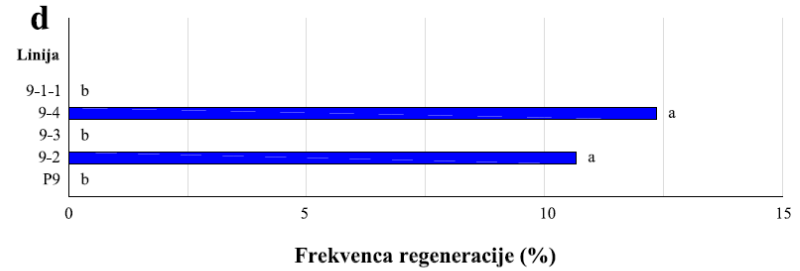
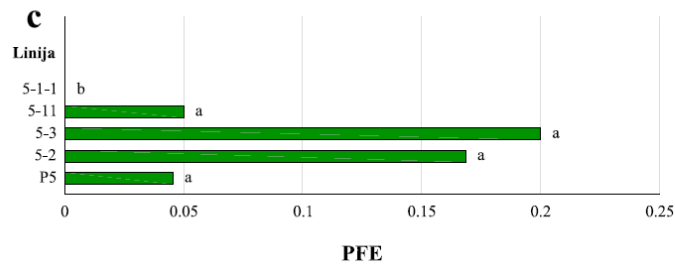
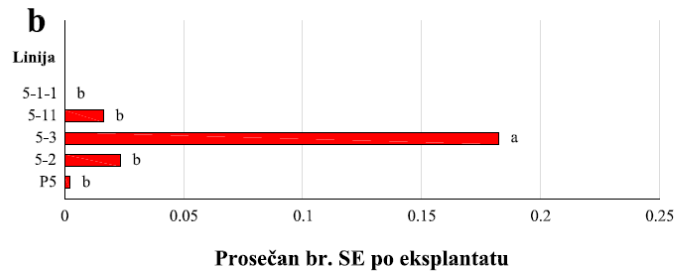
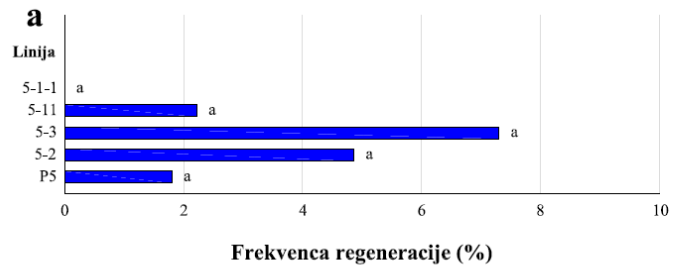
Potomstvo linije P18 pokazalo je izuzetnu varijabilnost regenerativnog kapaciteta. Frekvencija regeneracije se statistički značajno razlikovala ( $p \leq 0.05$ ) između linija i kretala se između 0.86% i 98.94% (Sl. 7a); prosečan broj SE po eksplantatu je takođe bio statistički značajno različit između linija ove grupe i iznosio je od 0.001 do 10.41 (Sl. 7b), dok je PFE indeks varirao od 0.002 do 10.61 (Sl. 7c). Od ukupno 32 testirane linije, tri nisu odgovorile na tretman. Sedam od 8 direktnih potomaka linije P18 pokazalo je veći regenerativni potencijal u odnosu na majku biljku. Potomci linije 18-15 su se pokazali kao najuspešniji. Linija 18-15 i dve potomačke linije su imale PFE indeks od 4.0 do 6.89 puta veći u odnosu na majku biljku P18.

Regenerativni kapacitet linije P238 je nepoznat jer je ta biljka korišćena u drugom eksperimentu. Devet direktnih potomaka linije P238 je pokazalo veliku varijabilnost regenerativnog potencijala, sa PFE indeksima od 0.07 do 8.37 (Sl. 8a-c). U okviru grupe 238, zabeležena je statistički značajna razlika frekvence regeneracije ( $p \leq 0.05$ ) i prosečnog broja SE po eksplantatu ( $p \leq 0.05$ ) između linija. Dok su linije 238-2 i 238-9 imale nizak

regenerativni potencijal, linija 238-6 je dala 12 potomaka čiji je embriogeni kapacitet rastao sa svakim novim ciklusom samooplodnje. PFE indeks je rastao od 1.33 kod majke biljke (238-6) do 1.98, 4.68 i 5.28 kod linija 238-6-1, -2 i -3. Regenerativni kapacitet najmanje uspješne linije 238-6-1 je dalje rastao, te je potomstvo 238-6-1-1, -2 i -3 imalo PFE indekse 13.24, 10.65, odnosno 8.21. Smanjenje PFE indeksa u odnosu na majku biljku (238-6-1) zapaženo je jedino kod potomačke linije 238-6-1-4 (PFE=0.86). Ukupni broj SE dobijen tokom 12 nedelja kod ove četiri linije je iznosio 886, 902, 1075, odnosno 174. Linija 238-6-2 nije dala potomstvo, dok je linija 238-6-3 dala potomstvo sa izuzetno visokim regenerativnim potencijalom (Sl. 4m-o) i PFE indeksima koji su bili 33 do 53 puta veći nego kod majke biljke 238-6. Preciznije, linije 238-6-3-1, -2 i -3 imale su PFE indekse 71.01, 44.09, odnosno 47.06, koji je ostao visok i nakon još jednog ciklusa samooplodnje kod linije 238-6-3-1-1 (43.62). Ukupan broj SE kod ovih linija nakon tri subkulture (12 nedelja) bio je 2181, 1726, 1547, odnosno 1339.

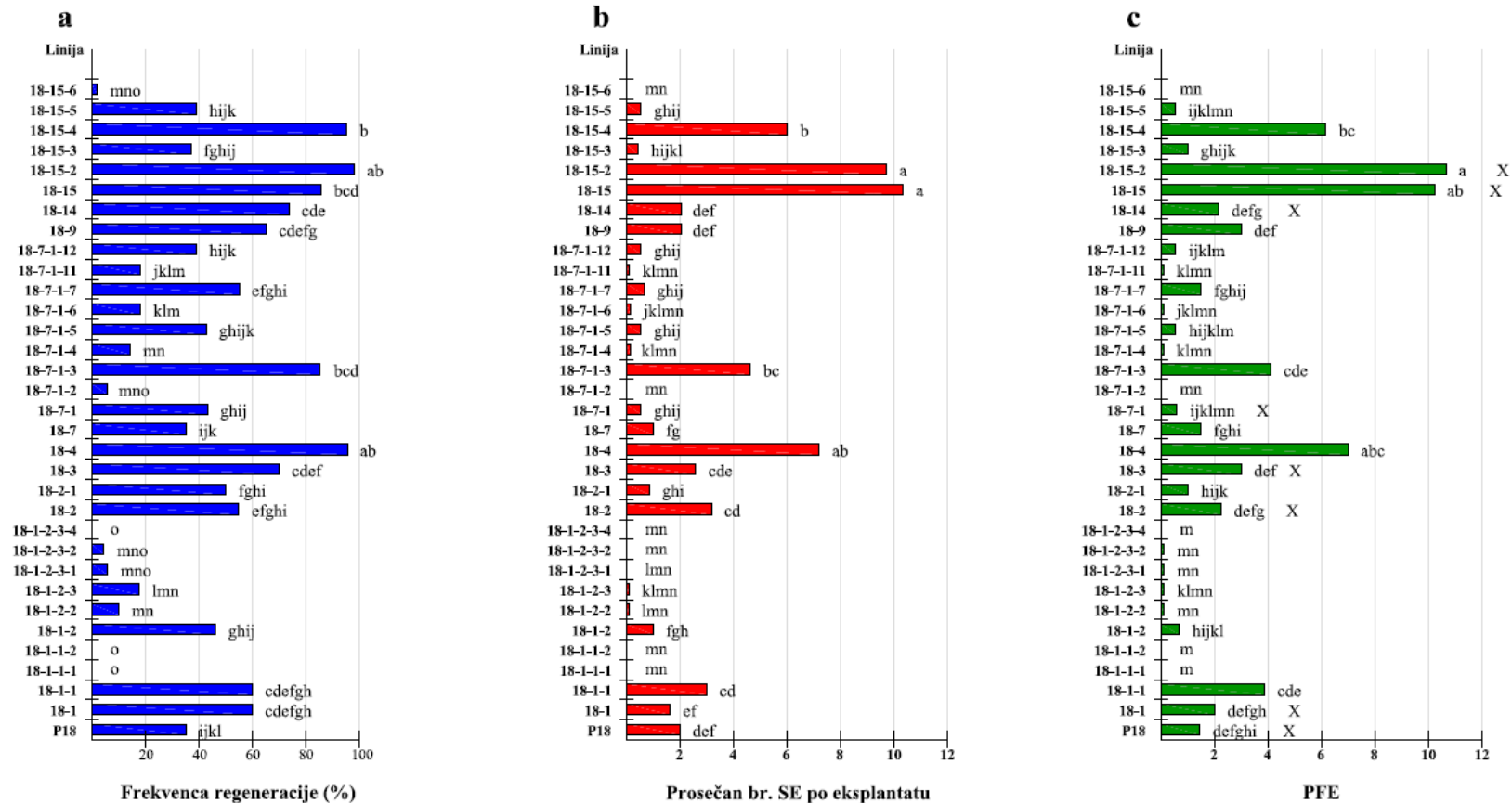
U okviru S-linija, linije sa niskim regenerativnim potencijalom ( $PFE \leq 0.45$ ) nisu regenerisale tokom prve subkulture. Nasuprot njima, linije sa visokim regenerativnim potencijalom ( $PFE \geq 8.21$ ) su uvek regenerisale tokom prve subkulture (Sl. 8c). Linije sa umerenim regenerativnim potencijalom ( $0.45 > PFE < 8.21$ ), su počinjale da regenerišu tokom druge, retko tokom prve subkulture. Linije sa najmanjim regenerativnim kapacitetom su počinjale da regenerišu tek krajem treće subkulture.

#### 4. Rezultati



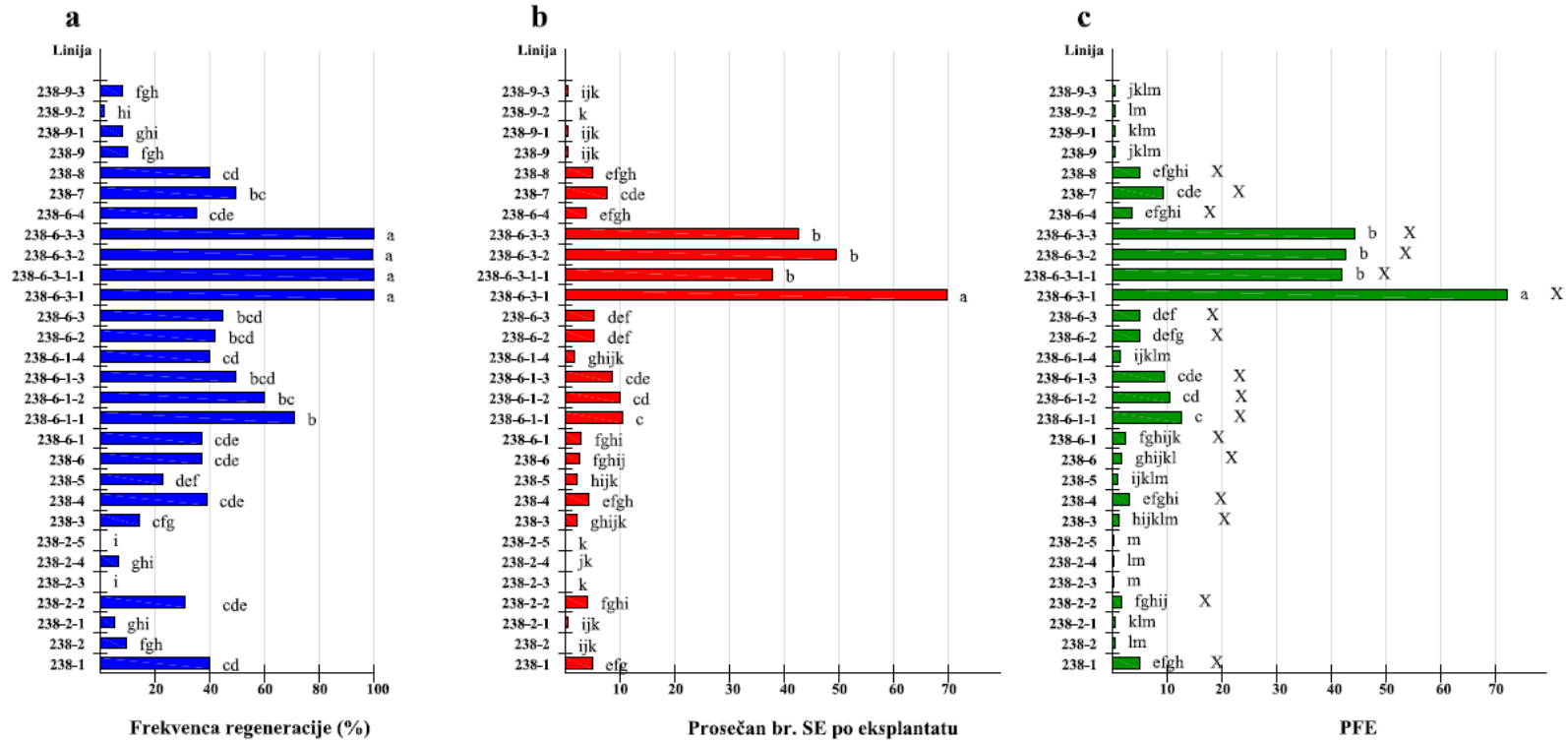
**Slika 6** – Somatska embriogeneza iz apikalnih fragmenata korenova klijanaca P5 (**a,b,c**) i P9 (**d,e,f**) i njihovog potomstva dobijenog samooprašivanjem *in vitro*. (**a, d**) Frekvenca regeneracije. (**b, e**) Prosečan broj SE po eksplantatu (**c, f**) Potencijal za formiranje somatskih embriona (PFE). Kvantifikacija je izvršena posle 12 nedelja gajenja eksplantata na medijumu sa 20  $\mu\text{M}$  NAA + 5  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>. Svi podaci predstavljaju srednje vrednosti. Za svaku liniju je postavljeno 6 Petri kutija sa po 5 eksplantata (n=30). Vrednosti na grafiku označene istim slovom nisu statistički značajno različite ( $p \leq 0.05$ ) prema LSD testu.

#### 4. Rezultati



**Slika 7** – Somatska embriogeneza iz apikalnih fragmenata korenova kljanaca P18 i njegovog potomstva dobijenog samooprašivanjem *in vitro*. (a) Frekvencija regeneracije. (b) Prosečan broj SE po eksplantatu (c) Potencijal za formiranje somatskih embriona (PFE). Kvantifikacija je izvršena posle 12 nedelja gajenja eksplantata na medijumu sa 20  $\mu$ M NAA + 5  $\mu$ M GA<sub>3</sub>. Svi podaci predstavljaju srednje vrednosti. Za svaku liniju je postavljeno 6 Petri kutija sa po 5 eksplantata (n=30). Vrednosti na grafiku označene istim slovom nisu statistički značajno različite ( $p < 0.05$ ) prema LSD testu. Linije označene sa X na grafiku (c) počinju da regenerišu u toku prve subkulture.

#### 4. Rezultati

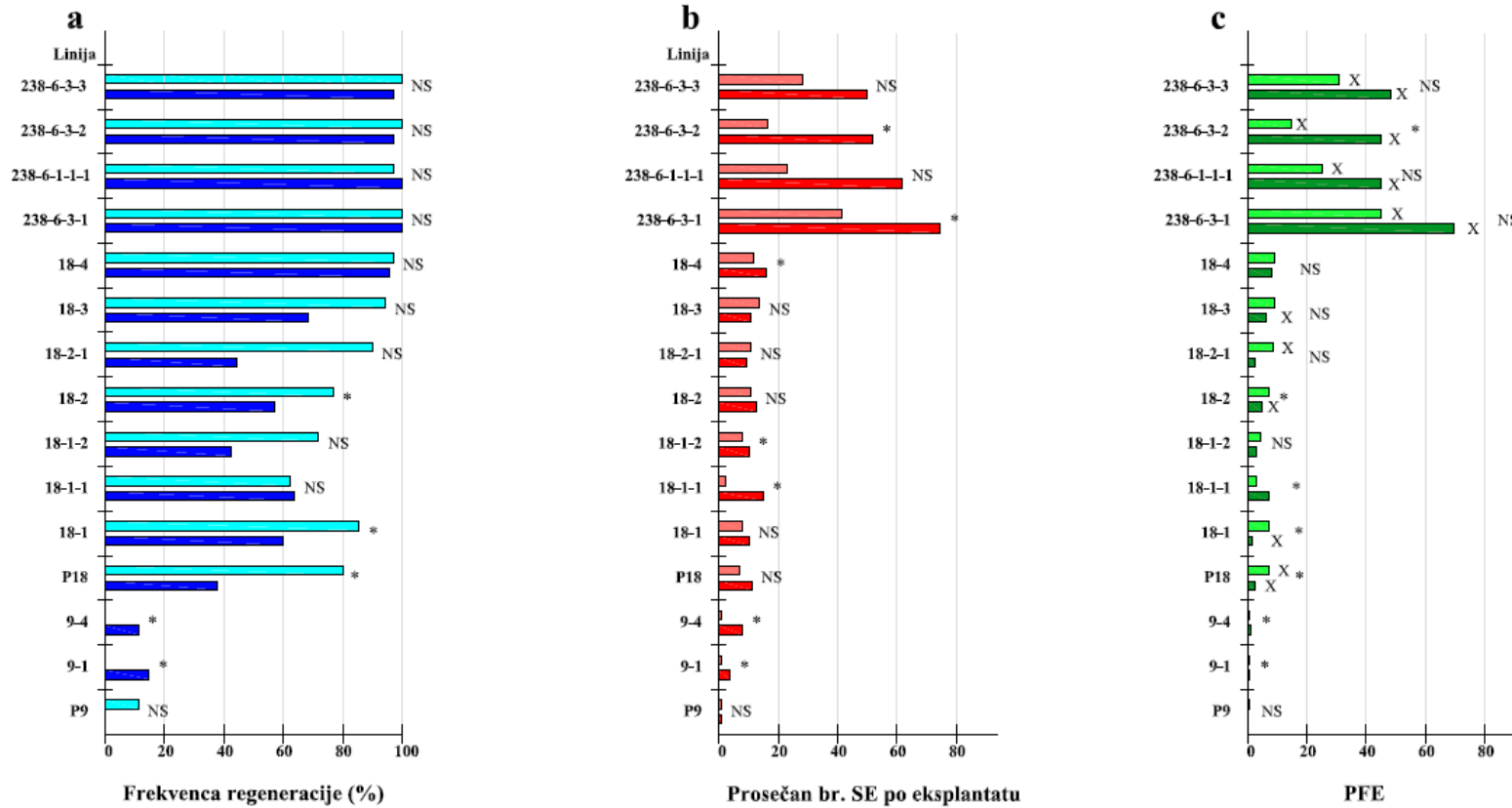


**Slika 8** – Somatska embriogeneza iz apikalnih fragmenata korenova klijanaca potomstva linije 238 dobijenog samooprašivanjem *in vitro*. (a) Frekvencija regeneracije. (b) Prosečan broj SE po eksplantatu (c) Potencijal za formiranje somatskih embriona (PFE). Kvantifikacija je izvršena posle 12 nedelja gajenja eksplantata na medijumu sa 20  $\mu$ M NAA + 5  $\mu$ M GA<sub>3</sub>. Svi podaci predstavljaju srednje vrednosti. Za svaku liniju je postavljeno 6 Petri kutija sa po 5 eksplantata (n=30). Vrednosti na grafiku označene istim slovom nisu statistički značajno različite ( $p \leq 0.05$ ) prema LSD testu. Linije označene sa X na grafiku (c) počinju da regenerišu u toku prve subkulture.

#### **4.1.4. Poređenje regenerativnog potencijala korenova klijanaca i regeneranata**

Korenovi izolovani sa biljaka regenerisanih iz SE (u daljem tekstu regeneranati) su proliferisali i regenerisali SE na isti način kao i korenovi izolovani sa odgovarajućeg klijanca (Sl. 4p). Frekvencija regeneracije iz fragmenata korenova regeneranata bila je slična frekvenciji regeneracije iz fragmenata korenova odgovarajućeg klijanca. Iako je frekvencija regeneracije bila nešto veća iz korenova regeneranata, samo u 5 od 15 slučajeva ta razlika se pokazala statistički značajnom (Sl. 9a). Prosečan broj SE po eksplantatu i PFE su bili nešto veći kod klijanaca u odnosu na regenerante, ali je razlika bila statistički značajna samo u 6 od 15 slučajeva kada je u pitanju broj SE i u 4 od 15 slučajeva kada su u pitanju PFE indeksi, a trend je ostao isti (Sl. 9b, c). Posmatrajući PFE indekse regeneranata, jasno se izdvajaju tri grupe: grupa 9 (sa niskim), grupa 18 (sa umerenim) i grupa 238 (sa visokim regenerativnim potencijalom). Linije sa najvećim regenerativnim potencijalom su imale stabilan regenerativni kapacitet najmanje dve godine, dok je kod linija sa niskim ili umerenim regenerativnim kapacitetom regeneracija postajala nestabilna posle 6-12 meseci.

#### 4. Rezultati



**Slika 9** – Somatska embriogeneza iz apikalnih fragmenata korenova odabranih P- i S-klijanaca i odgovarajućih regeneranata. **(a)** Frekvenca regeneracije. **(b)** Prosečan broj SE po eksplantatu **(c)**. Potencijal za formiranje somatskih embriona (PFE). Kvantifikacija je izvršena posle 12 nedelja gajenja eksplantata na medijumu sa 20  $\mu\text{M}$  NAA + 5  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>. Svi podaci predstavljaju srednje vrednosti. Za svaki klijanac je postavljeno po 6 Petri kutija sa po 5 eksplantata (n=30), dok su za regenerante svake linije postavljene 4 petri kutije sa po 5 eksplantata i eksperiment je ponavljen 2 puta (n=40). Klijanci i regeneranti iste linije upoređivani su t-testom za zavisne uzorke. Tamniji stubići na grafikonu predstavljaju vrednosti za klijance, dok svetliji predstavljaju vrednost za regenerante. NS - statistički neznačajna razlika, \* - statistički značajna razlika. Linije označene sa X na grafiku (c) počinju da regenerišu u toku prve subkulture.

#### 4.1.5. Uticaj fotoperioda na regenerativni potencijal korenova

Proces regeneracije SE iz apikalnih fragmenata lateralnih korenova je efikasniji u uslovima DD nego u uslovima KD, dok u mraku samo retko dolazi do regeneracije SE (Sl. 10a-c). U mraku regeneriše samo jedan do nekoliko SE po eksplantatu i oni su etiolirani (Sl. 10d-e), ali klijaju u normalne biljke posle nekoliko dana gajenja u uslovima DD (Sl. 10f).

Kod svih 40 testiranih linija klijanaca, korenovi gajeni u uslovima DD odgovorili su sa većom frekvencom regeneracije nego korenovi istog porekla u uslovima KD (Sl. 11a). ANOVA je pokazala da i genotip ( $p \leq 0.0001$ ) i fotoperiod ( $p \leq 0.0001$ ), kao i njihova interakcija ( $p \leq 0.0001$ ) statistički značajno utiču na frekvencu regeneracije. U uslovima DD frekvencu regeneracije je bila veća kod 38 od 40 testiranih linija u odnosu na KD, dok su kod 2 linije frekvence regeneracije bile približne. Kod ove dve linije razlike u frekvenci regeneracije nisu bile statistički značajne, tako da nije zabeležen ni jedan slučaj statistički značajno veće frekvence regeneracije u uslovima KD nego u uslovima DD. U okviru linija koje su regenerisale SE, frekvencu regeneracije u uslovima DD je bila veća od 1.4 do 45.1 puta nego u uslovima KD (Sl. 11a). Najveće povećanje frekvence regeneracije uočeno je kod linija 102, 103, 143 i 153, i iznosilo je 33.2, 21.9, 45.1 i 29.2 puta. Važno je istaći i činjenicu da je 7 od 40 testiranih linija regenerisalo samo u uslovima DD.

Uticaj fotoperioda na prosečan broj SE po eksplantatu je bio još izraženiji. ANOVA je pokazala statistički značajan uticaj kako genotipa ( $p \leq 0.0001$ ) tako i fotoperioda ( $p \leq 0.0001$ ) i njihove interakcije ( $p \leq 0.0001$ ) na ovu promenljivu. Prosečan broj SE po eksplantatu u uslovima DD se kretao od 0.3 do 24.33, dok je u uslovima KD iznosio od 0 do 11.56. Bez obzira na veoma veliku varijabilnost između testiranih linija, prosečan broj SE po eksplantatu je kod iste linije uvek bio veći u uslovima DD u odnosu na uslove KD (Sl. 11b). Samo kod 2 od 40 linija nije pokazana statistički značajna razlika između broja SE u uslovima DD i KD (Sl. 11b). Izuzetno veliko povećanje prosečnog broja SE, više od 100 puta, je uočeno kod linija 103, 107, 112, 143 i 153.

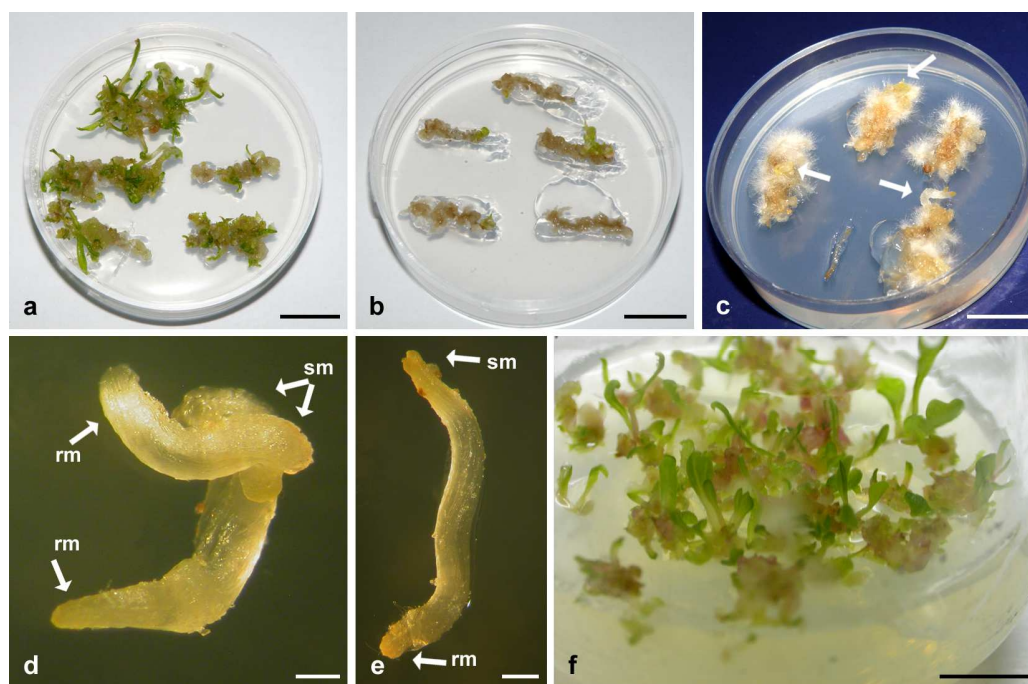
U skladu sa pomenutim rezultatima je i vrednost PFE indeksa koja je bila značajno veća u uslovima DD. Na vrednosti PFE indeksa je značajno uticao genotip ( $p \leq 0.0001$ ),



fotoperiod ( $p \leq 0.0001$ ) i njihova interakcija ( $p \leq 0.0001$ ). PFE indeks se kretao od 0.29 do 28.57 u uslovima DD, dok je u uslovima KD varirao od 0 do 11.4 (Sl. 11c).

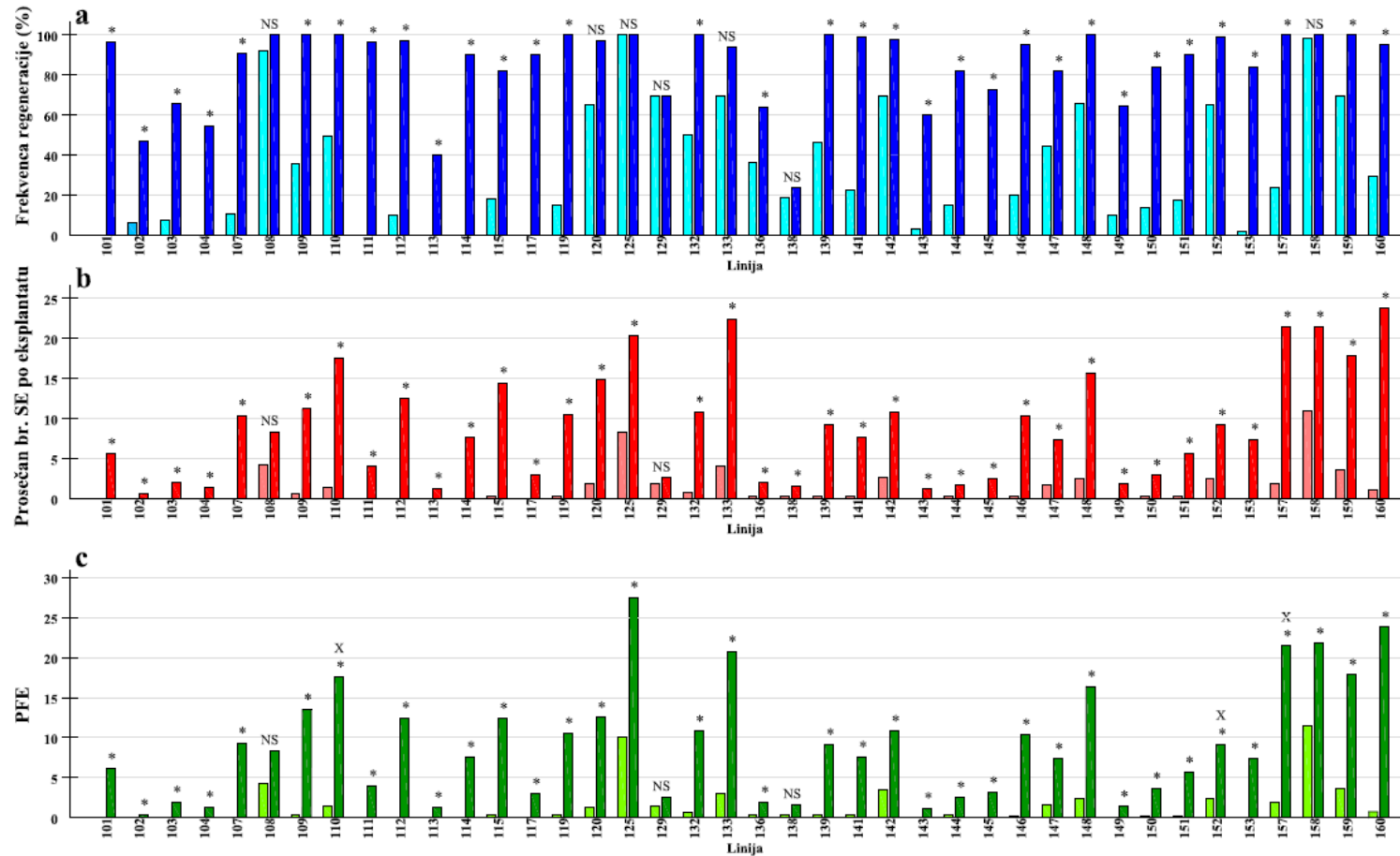
U skladu sa efikasnijom regeneracijom u uslovima DD je i činjenica da regeneracija uvek počinje ranije u uslovima DD u odnosu na KD. Kod svih testiranih linija uočeno je kašnjenje regeneracije od oko 4 nedelje u uslovima KD u odnosu na DD. U ovom eksperimentu su samo tri linije (110, 152 i 157) regenerisale tokom prve subkulture, dok je većina linija regenerisala tokom druge subkulture. Dve linije počele su da regenerišu tek pri kraju treće subkulture.

SE dobijeni u uslovima DD i KD su se na medijumu sa  $5 \mu\text{M}$  Kin razvili u zdrave i morfološki normalne biljke sa dobro razvijenim korenovim sistemom (Sl. 10f).



**Slika 10** – Somatska embriogeneza iz apikalnih fragmenata lateralnih korenova izolovanih sa jednog klijanca spanaća u uslovima (a) DD (b) KD i (c) u mraku (embrioni su označeni strelicom). (d -e) Etiolirani SE dobijeni u mraku su se razvili u normalne biljke posle nekoliko dana gajenja u uslovima DD (f). sm - meristem izdanka; rm - meristem korena. Bar: a-c, f 1cm; d-e 1 mm.

#### 4. Rezultati

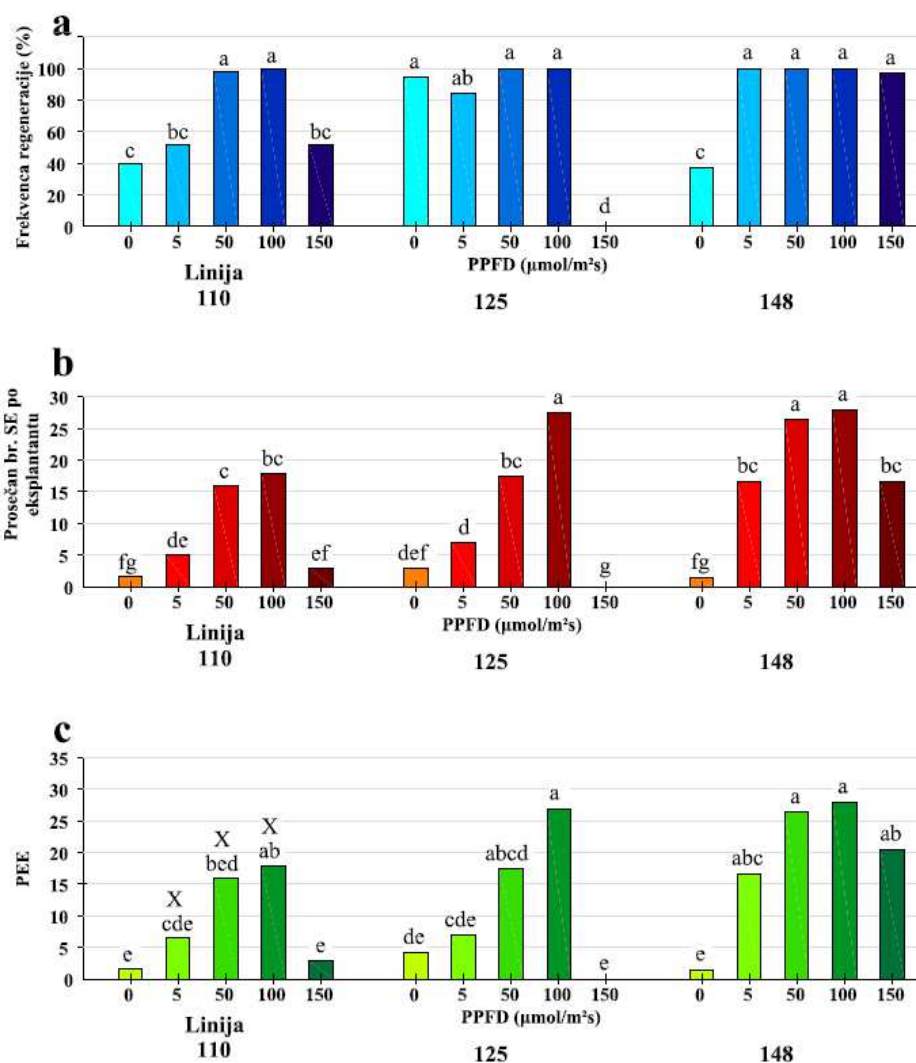


**Slika 11** – Somatska embriogeneza iz apikalnih odsečaka korenova izolovanih sa 40 kljanaca nasumično odabranih iz populacije i gajenih u uslovima DD i KD. **(a)** Frekvenca regeneracije. **(b)** Prosečan broj SE po eksplantatu. **(c)** Potencijal za formiranje somatskih embriona (PFE). Kvantifikacija je izvršena posle 12 nedelja gajenja eksplantata na medijumu sa 20  $\mu\text{M}$  NAA + 5  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>. Podaci predstavljaju srednje vrednosti. Za svaki tretman i za svaku liniju su postavljene po 4 Petri kutije sa po 5 fragmenata korenova (n=20). DD i KD tretmani u okviru jedne linije (kljanca) su upoređivani t - testom za zavisne uzorke (p $\leq$ 0.05). Tamniji stubići na grafikonu predstavljaju vrednosti za DD, a svetliji za KD. NS - statistički neznačajno različito, \* - statistički značajno različito. Linije označene sa X na (c) grafiku počinju da regenerišu u toku prve subkulture.

#### 4.1.6. Uticaj intenziteta svetlosti na regenerativni potencijal korenova

Uticaj intenziteta svetlosti (gustine fluksa fotona) na regenerativni potencijal korenova spanača je testiran kod tri linije regeneranata. Gustina fluksa svetlosti je statistički značajno uticala na frekvencu regeneracije ( $p \leq 0.01$ ), prosečan broj SE po eksplantatu ( $p \leq 0.0001$ ) i indeks PFE ( $p \leq 0.0001$ ). Međutim, regenerativni odgovor individualnih linija se razlikovao, pa je i genotip statistički značajno uticao na frekvencu regeneracije ( $p \leq 0.0001$ ), broj SE po eksplantatu ( $p \leq 0.0001$ ) i indeks PFE ( $p \leq 0.0001$ ). Interakcija genotipa i gustine fluksa svetlosti je statistički značajno uticala na frekvencu regeneracije ( $p \leq 0.0001$ ) i prosečan broj SE po eksplantatu ( $p \leq 0.0001$ ), dok na PFE indeks nije značajno uticala ( $p = 0.17$ ).

Sve testirane linije su regenerisale SE u mraku sa frekvencom regeneracije od 39.5% do 94.9% (Sl. 12a). Međutim, iako je frekvenca regeneracije bila relativno visoka, prosečan broj SE po eksplantatu je bio nizak i iznosio je od 0.65 do 3.39 (Sl. 12b). Najveća frekvenca regeneracije od oko 100% postignuta je kod eksplantata linija 125 i 148 izloženih gustini fluksa svetlosti 5-100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ . Kod linije 110 najveća frekvenca regeneracije je postignuta pri gustini fluksa svetlosti 50-100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ . Regenerativni potencijal kod linija 110 i 148 je opadao pri gustini fluksa svetlosti od 150  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ , dok je kod linije 125 pri ovom intenzitetu svetlosti regeneracija bila potpuno inhibirana (Sl. 12a-c). Kod sve tri linije i prosečan broj SE po eksplantatu i PFE indeks su bili najveći pri gustini fluksa svetlosti od 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$  (Sl. 12b-c). Korenovi linije 110 su regenerisali SE u toku prve subkulture pri gustini fluksa svetlosti 5-100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ , dok je u mraku i na 150  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$  regeneracija bila odložena za oko 4 nedelje.

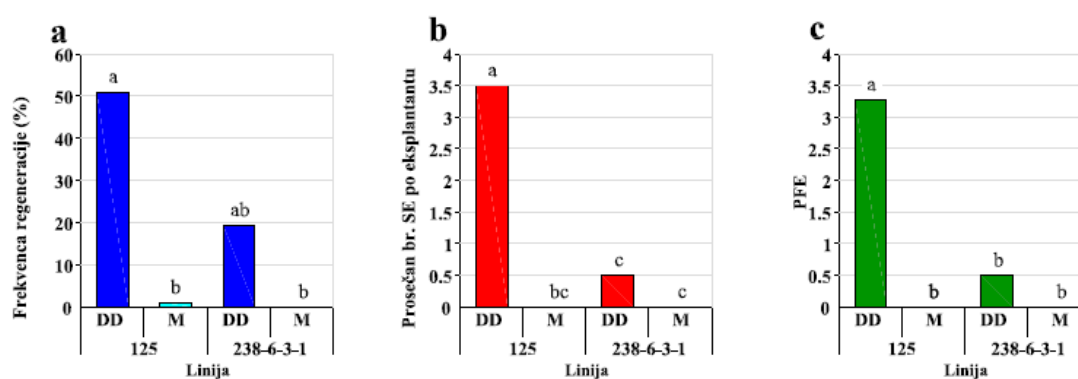


**Slika 12** – Efekat intenziteta svetlosti (gustine fluksa fotona) na indukciju SE iz fragmenata korenova regeneranata tri linije spanaća. (a) Frekvencija regeneracije. (b) Prosečan broj SE po eksplantatu. (c) Potencijal za formiranje somatskih embriona (PFE). Kvantifikacija je izvršena posle 12 nedelja gajenja eksplantata na medijumu sa 20  $\mu\text{M}$  NAA + 5  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>. Podaci predstavljaju srednje vrednosti. Za svaki tretman i za svaku liniju postavljene su po 4 Petri kutije sa po 5 fragmenata korenova (n=20). Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p \leq 0.05$ ) prema LSD testu. Linije označene sa X na grafiku (c) počinju da regenerišu u toku prve subkulture.

#### 4.1.7. Uticaj egzogenih giberelina na regenerativni potencijal korenova

Većina testiranih linija spanaća, čiji je regenerativni potencijal proučavan u ovoj studiji, nisu imale sposobnost regeneracije u odsustvu egzogene GA<sub>3</sub>. Samo dve od devet testiranih linija, 125 i 238-6-3-1, su regenerisale SE i bez prisustva egzogene GA<sub>3</sub> (Sl. 13a-c), pa je kod ovih linija analiziran uticaj svetlosti na regenerativni potencijal u odsustvu giberelina i prisustvu 20 μM NAA kao jedinog BRR. Eksplantati koji su bili izloženi svetlosti su gajeni u uslovima DD pri optimalnoj gustini fluksa svetlosti od 100 μmol/(m<sup>2</sup>s). Na regenerativni potencijal (PFE indeks) pod ovim uslovima je značajno uticalo prisustvo svetlosti (p≤0.05). Genotip (p=0.1) kao i interakcija genotipa i prisustva svetlosti (p=0.1) nisu statistički značajno uticali na regenerativni potencijal.

U mraku je linija 125 imala izuzetno nizak regenerativni potencijal (PFE=0.009), dok linija 238-6-3-1 nije regenerisala (Sl. 13c). U uslovima DD, kod linije 125 frekvencija regeneracije je iznosila 52.46% (Sl. 13a), sa prosečno 3.53 SE po eksplantatu (Sl. 13b) i PFE indeksom 3.21 (Sl. 13c). Kod linije 238-6-3-1 su postignute niže vrednosti za sve parametre (Sl. 13a-c).



**Slika 13** – Somatska embriogeneza iz fragmenata korenova regeneranata linija 125 i 238-6-3-1 na bazalnom medijumu bez egzogenih giberelina, u uslovima DD i mraka (M). (a) Frekvencija regeneracije. (b) Prosečan broj SE po eksplantatu. (c) Potencijal za formiranje somatskih embriona (PFE). Kvantifikacija je izvršena posle 12 nedelja gajenja eksplantata na medijumu sa 20 μM NAA. Podaci predstavljaju srednje vrednosti. Za svaki tretman i za svaku liniju su postavljene po 4 Petri kutije sa po 5 fragmenata korenova (n=20). DD - dugi dan, M - mrak. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite (p≤0.05) prema LSD testu.

U daljim istraživanjima je testiran uticaj dva egzogeno dodata giberelina ( $GA_1$  i  $GA_3$ ) i određena njihova optimalna koncentracija u medijumu. Za indukciju regeneracije su korišćeni korenovi regeneranata linija 125 i 238-6-3-1. Obe linije pokazale su sličan regenerativni odgovor pod uticajem egzogenih  $GA_1$  i  $GA_3$ .

Kod obe testirane linije na frekvencu regeneracije su statistički značajno uticali prisustvo svetlosti ( $p \leq 0.001$  za liniju 125 i  $p \leq 0.05$  za liniju 238-6-3-1) i tip GA ( $p \leq 0.05$  za obe linije), dok interakcija ova dva faktora nije statistički značajno uticala na frekvencu regeneracije obe linije ( $p = 0.42$  za liniju 125 i  $p = 0.63$  za liniju 238-6-3-1). Linija 125 je regenerisala sa frekvencom od 100% na svim testiranim koncentracijama  $GA_3$  u uslovima DD, dok u mraku frekvencu regeneracije nije dostigla 100% ni na jednoj koncentraciji  $GA_3$ . Na svim testiranim koncentracijama  $GA_3$  je pokazao izraženiji efekat od  $GA_1$  (Sl. 14a). Najveća frekvencu regeneracije linije 238-6-3-1 je zabeležena u prisustvu  $5 \mu M$   $GA_3$  u uslovima DD i iznosila je 94.88%. I kod ove linije, u uslovima DD zabeležena je veća frekvencu regeneracije u prisustvu  $GA_3$  u odnosu na  $GA_1$  za sve testirane koncentracije, izuzev  $2.5 \mu M$  gde nije bilo statistički značajne razlike u delovanju ova dva GA. U mraku je frekvencu regeneracije bila veća na  $2.5 \mu M$   $GA_1$  u odnosu na  $2.5 \mu M$   $GA_3$ , ali razlike nisu bile statistički značajne (Sl. 14d).

Prosečan broj SE po eksplantatu kod linije 125 je uvek bio veći u prisustvu  $GA_3$  u poređenju sa  $GA_1$ , bez obzira na prisustvo svetlosti. Na prosečan broj SE kod ove linije statistički značajno su uticali prisustvo svetlosti ( $p \leq 0.001$ ), tip GA ( $p \leq 0.001$ ), kao i njihova interakcija ( $p \leq 0.001$ ). Najveći prosečan broj SE (40.32) je zabeležen u uslovima DD na medijumu sa  $2.5 \mu M$   $GA_3$  (Sl. 14b). Sličan trend je pokazala i linija 238-6-3-1. Statistički značajan uticaj na prosečan broj SE kod ove linije su imali prisustvo svetlosti ( $p \leq 0.001$ ) i tip GA ( $p \leq 0.001$ ), ali ne i njihova interakcija ( $p = 0.34$ ). Najveći prosečan broj SE po eksplantatu (12.8) je zabeležen u uslovima DD na medijumu sa  $5 \mu M$   $GA_3$ . Pri koncentracijama  $7.5 \mu M$  i  $10 \mu M$   $GA_3$  je bio efikasniji od  $GA_1$  u uslovima DD, dok pri  $2.5 \mu M$  i  $5 \mu M$  razlike nisu bile statistički značajne (Sl. 14e). U mraku je  $5 \mu M$  i  $7.5 \mu M$   $GA_3$  bio efikasniji od  $GA_1$  (Sl. 14e).

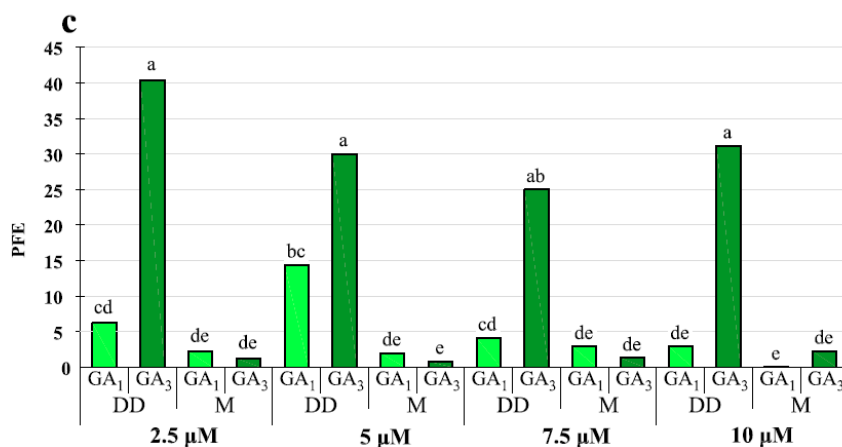
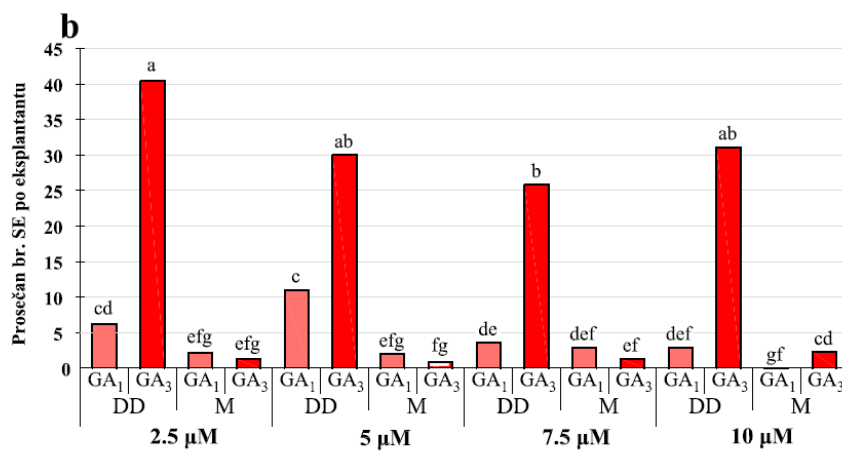
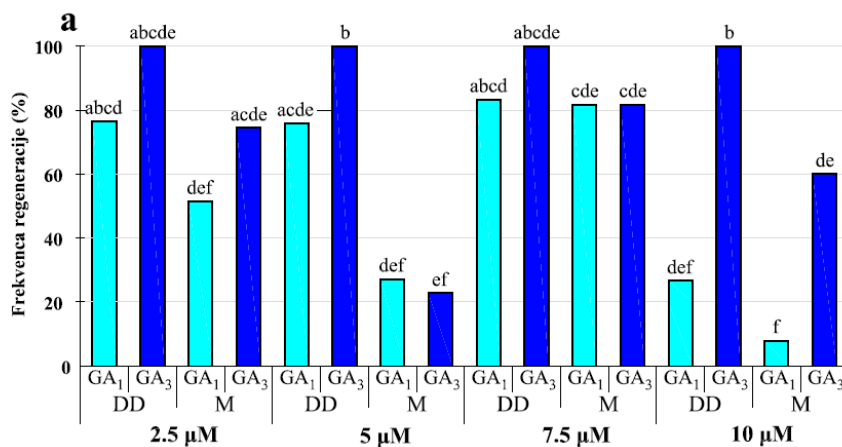
Na vrednost PFE indeksa obe testirane linije statistički značajno su uticali prisustvo svetlosti ( $p \leq 0.001$  za obe linije) i tip GA ( $p \leq 0.01$  za liniju 125 i  $p \leq 0.001$  za liniju

238-6-3-1), dok je njihova interakcija statistički značajno uticala samo na PFE indeks linije 125 ( $p \leq 0.01$ ). Najveća vrednost PFE indeksa za liniju 125 (40.34) je postignuta u uslovima DD na medijumu sa  $2.5 \mu\text{M GA}_3$  (Sl. 14c). Slično, maksimalna vrednost PFE indeksa za liniju 238-6-3-1 (12.4) je postignuta u uslovima DD, na medijumu sa  $5 \mu\text{M GA}_3$  (Sl. 14f). Iako stabilan, embriogeni potencijal linije 238-6-3-1 je bio značajno niži u ovom eksperimentu nego u prvim eksperimentima sprovedenim nekoliko godina ranije na ovoj liniji (Sl. 8c). To je u skladu sa činjenicom da embriogeni potencijal svih linija spanaća opada tokom vremena. Linija 238-6-3-1 još uvek nije potpuno izgubila regenerativni kapacitet, posle 6 godina kultivisanja.

#### **4.1.8. Uticaj higromicina na regenerativni potencijal korenova**

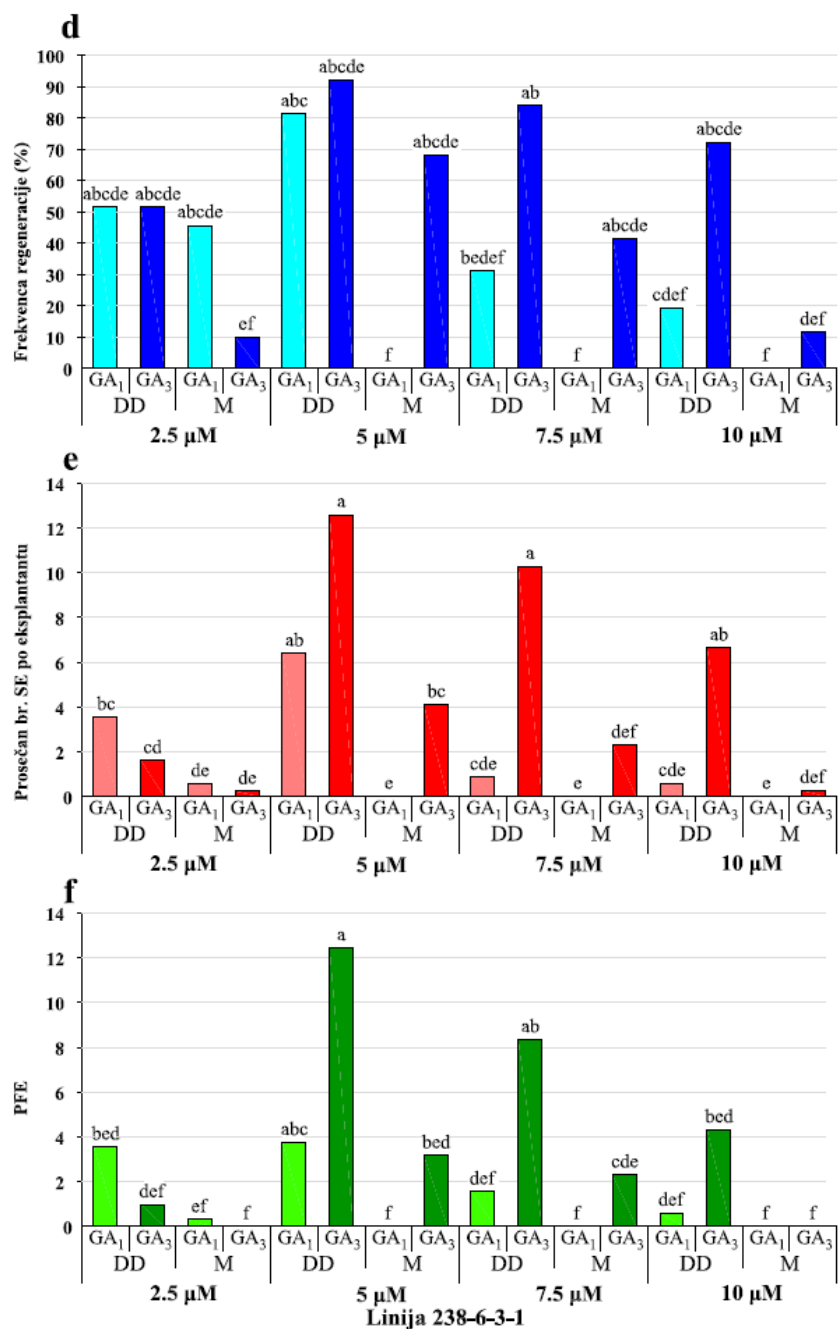
##### **4.1.8.1. Uticaj higromicina na indukciju somatske embriogeneze**

Pošto je razvijen izuzetno pouzdan i efikasan sistem za regeneraciju SE iz fragmenata korenova spanaća, testiran je uticaj higromicina (hyg), koji se vrlo često koristi kao selektivni agens za selekciju transformisanih biljnih ćelija, na embriogeni potencijal korenova spanaća. Apikalni fragmenti korenova spanaća gajeni na medijumu sa varijabilnim koncentracijama hyg su proliferisali, ali voluminozan kalus nije uočen za sve vreme trajanja eksperimenta (Sl. 15). Na medijumu sa 0-2.5 mg/l hyg na korenovima su se formirale proliferacije, ali nekroza nije uočena (Sl. 15a-c). Blaga nekroza je uočena tek na korenovima gajenim na medijumu sa 5 mg/l hyg. Međutim, proliferacija korenova nije bila inhibirana na medijumu sa 7.5-10 mg/l hyg (Sl. 15d), ali su zone proliferacije nekrozirale nakon 10 dana u kulturi. Proliferacija korenova spanaća je bila potpuno inhibirana na medijumu sa 20 mg/l hyg.



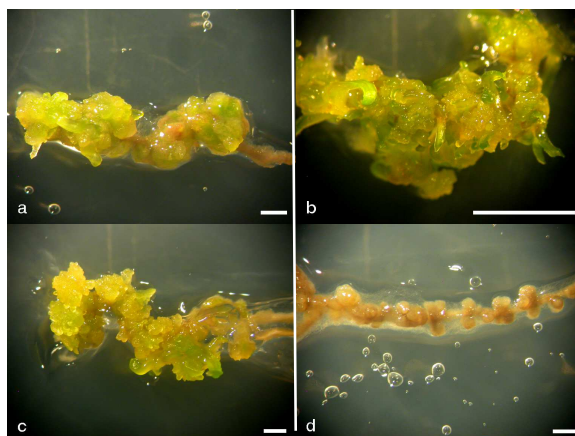
Linija 125



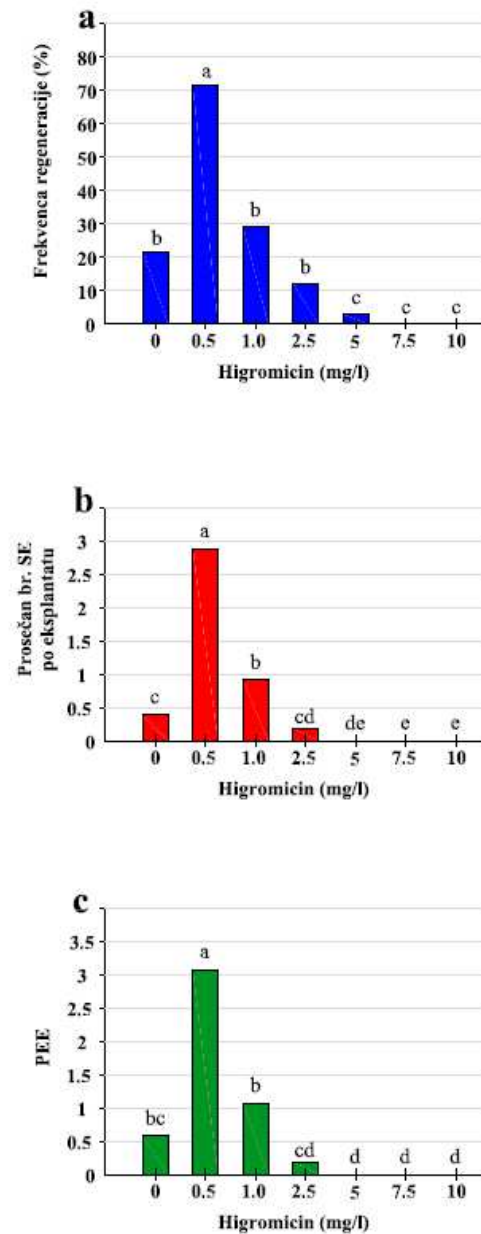


**Slika 14** – Somatska embriogeneza iz fragmenata korenova regeneranata linija 125 (a,b,c) i 238-6-3-1(d,e,f) na bazalnom medijumu sa varijabilnom koncentracijom GA<sub>1</sub> i GA<sub>3</sub> (2.5, 5, 7.5 i 10 µM) u uslovima DD i mraka. (a, d) Frekvencija regeneracije. (b, e) Prosečan broj SE po eksplantatu. (c, f) Potencijal za formiranje somatskih embriona (PFE). Kvantifikacija je izvršena posle 12 nedelja. Podaci predstavljaju srednje vrednosti. Za svaki tretman su postavljene po 4 Petri kutije sa po 5 fragmenata korenova (n=20). DD - uslovi dugog dana, M - mrak. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite (p<0.05) prema LSD testu.

Koncentracija hyg u medijumu je statistički značajno uticala na frekvencu regeneracije ( $p \leq 0.0001$ ) i prosečan broj SE po eksplantatu ( $p \leq 0.0001$ ). Niske doze hyg (0.5-1 mg/l) su stimulisale regeneraciju SE (Sl. 16). Frekvencu regeneracije i prosečan broj SE po eksplantatu su imali najveću vrednost na medijumu sa 0.5 mg/l hyg. Obe veličine su bile značajno niže za eksplantate gajene na medijumu sa 1 mg/l hyg (Sl. 16a-b). Iako frekvencu regeneracije nije bila statistički značajno različita na medijumu bez i sa 1 mg/l hyg, prosečan broj SE po eksplantatu je bio dva puta veći na medijumu sa 1 mg/l hyg u odnosu na medijum bez hyg (Sl. 16b). Regeneracija eksplantata je bila potpuno inhibirana na medijumu sa 7.5 mg/l hyg. Očekivano, koncentracija hyg u medijumu je statistički značajno uticala i na PFE indeks ( $p \leq 0.0001$ ), koji je bio 2.7 puta veći kod eksplantata gajenih na medijumu sa 0.5 mg/l hyg u odnosu na medijum bez hyg (Sl. 16c).



**Slika 15** – Somatska embriogeneza iz apikalnih fragmenata korenova spanaća gajenih na medijumu za indukciju regeneracije sa dodatkom higromocina u koncentracijama od: (a) 0 mg/l (b) 0.5 mg/l (c) 2.5 mg/l i (d) 7.5 mg/l tokom 4 nedelje. Bar: a-d 1 mm.



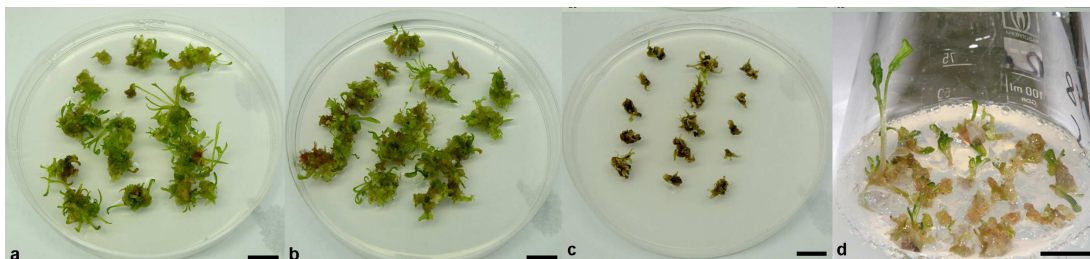
**Slika 16** – Somatska embriogeneza iz apikalnih fragmenata korenova spanaća gajenih na medijumu za indukciju regeneracije sa 0-10 mg/l hyg tokom 4 nedelje. **(a)** Frekvencija regeneracije. **(b)** Prosečan broj SE po eksplantatu. **(c)** Potencijal za formiranje somatskih embriona (PFE). Podaci predstavljaju srednje vrednosti. Za svaki tretman su postavljene po 4 Petri kutije sa po 20 fragmenata korenova (n=80). Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p \leq 0.05$ ) prema LSD testu.

#### 4.1.8.2. Tolerancija SE na higromicin i indukcija sekundarne somatske embriogeneze

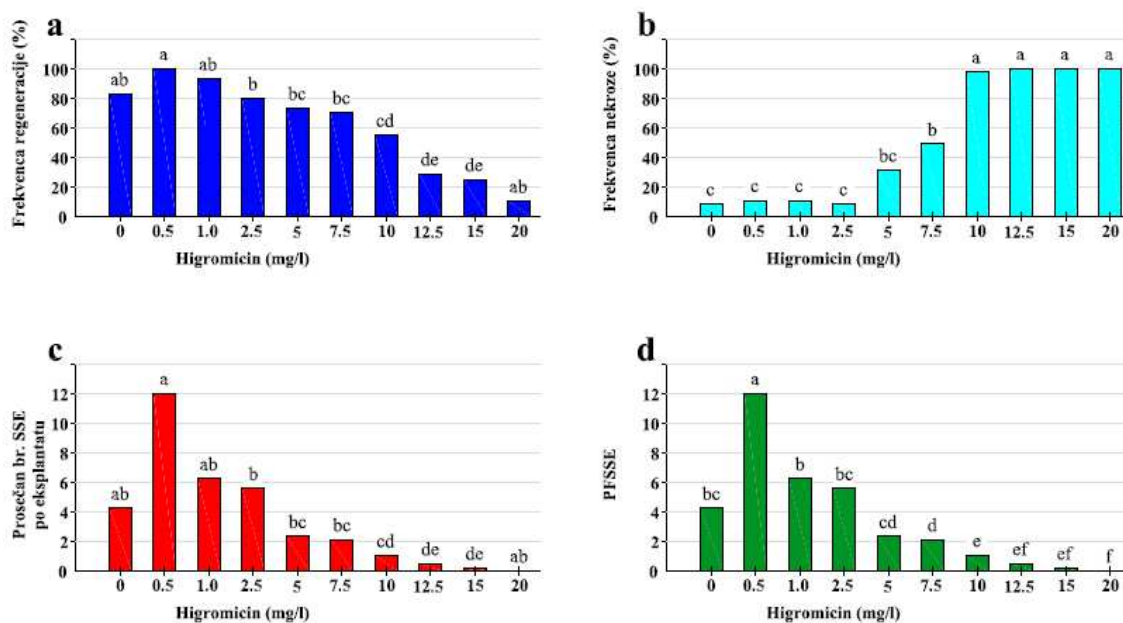
Uočen je pozitivan uticaj hyg na sposobnost SE za sekundarnu embriogenezu (Sl. 17). Koncentracija hyg u medijumu je značajno uticala na frekvencu regeneracije sekundarnih somatskih embriona (SSE) ( $p \leq 0.0001$ ) i frekvencu nekroze ( $p \leq 0.0001$ ), kao i na prosečan broj SE po eksplantatu ( $p \leq 0.01$ ). Frekvencija sekundarne embriogeneze je bila najveća na medijumu sa 0.5 mg/l hyg (100%), mada vrednosti frekvence regeneracije nisu bile statistički značajno različite u opsegu 0-1 mg/l hyg (Sl. 18a). SSE su se formirali sa niskom frekvencom (7.4%) čak i na SE koji su gajeni na medijumu sa 20 mg/l hyg, ali su vrlo brzo nekrozirali. Frekvencija nekroze je bila niska (do 8.9%) na medijumu sa 0-2.5 mg/l hyg, da bi naglo porasla do 98.1% na medijumu sa 10 mg/l hyg. Letalna doza (100% nekroze) hyg je 12.5 mg/l (Sl. 18b i Sl. 17a-c). SSE indukovani na medijumu sa 10 mg/l hyg ili višom su nekrozirali nakon jedne do dve nedelje.

Prosečan broj SSE po eksplantatu gajenih na medijumu sa 0.5 mg/l hyg je bio 2.75 puta veći u odnosu na eksplantate gajene na medijumu bez hyg. Sa povećanjem koncentracije hyg je došlo do pada regenerativnog potencijala, tako da je prosečan broj SSE po eksplantatu na medijumu sa 1 i 2.5 mg/l hyg bio samo neznatno veći od kontrole, mada statistički ne značajno različit (Sl. 18c i Sl. 17a-b). Vrednost PFE indeksa za SSE (PFSSE) su takođe bile statistički značajno različite ( $p \leq 0.0001$ ) za različite hyg tretmane, a 0.5 mg/l hyg je bio najefikasniji tretman (Sl. 17d).

SSE regenerisani na medijumu sa 0.5-2.5 mg/l hyg nisu pokazivali nikakve znake nekroze, dok su SSE regenerisani na medijumu sa većim koncentracijama hyg od 2.5 mg/l bili blago malformisani. Bez obzira na to, svi SSE gajeni na medijumu sa 5  $\mu$ M KIN bez hyg su se razvili u zdrave biljke, normalnog fenotipa koje su se ožiljavale i cvetale (Sl. 17d).



**Slika 17** – Regeneracija sekundarnih somatskih embriona (SSE) iz primarnih SE posle 4 nedelje na medijumu za indukciju regeneracije sa dodatkom higromicina u koncentraciji od: (a) 0 mg/l (b) 1 mg/l i (c) 10 mg/l. (d) SSE dobijeni sa medijuma za indukciju regeneracije + 1 mg/l hyg, subkultivirani na medijum bez hyg sa 5 µM KIN, su se razvili u normalne biljke. Bar: a-d 1cm.



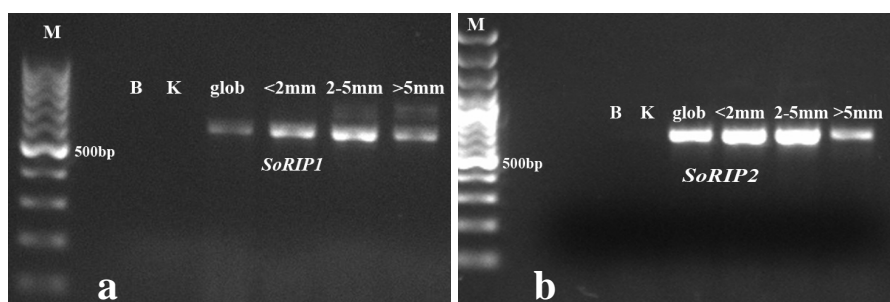
**Slika 18** – Sekundarna somatska embriogeneza iz primarnih SE posle 4 nedelje na medijumu za indukciju regeneracije sa 0-20 mg/l hyg. (a) Frekvencija sekundarne regeneracije. (b) Frekvencija nekroze eksplantata. (c) Prosečan broj sekundarnih somatskih embriona po primarnom SE. (d) Potencijal za formiranje sekundarnih somatskih embriona (PFSSE). Podaci predstavljaju srednje vrednosti. Za svaki tretman su postavljene po 3 Petri kutije sa po 15 primarnih SE (n=45). Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p \leq 0.05$ ) prema LSD testu.

## 4.2. Ekspresija gena potencijalnih markera somatske embriogeneze i gena uključenih u metabolizam giberelina spanaća

### 4.2.1. Izbor molekularnih markera za praćenje somatske embriogeneze spanaća

#### 4.2.1.1. Ekspresija *SoRIP1* i *SoRIP2* tokom razvića somatskih embriona

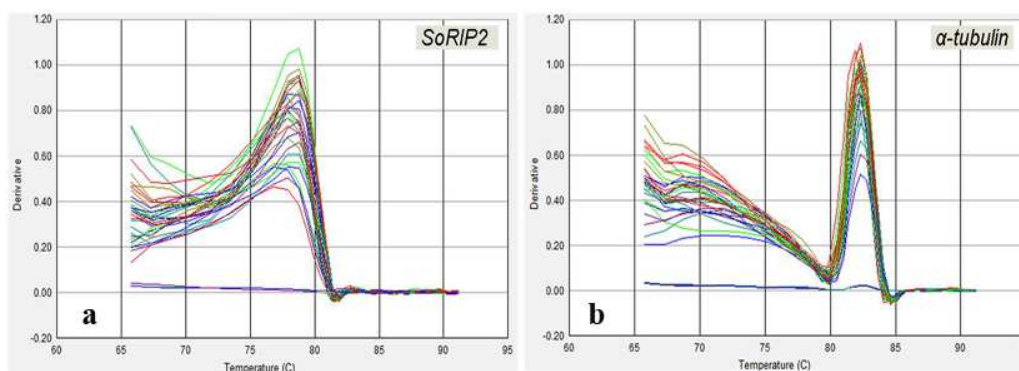
Nivo ekspresije *SoRIP1* i *SoRIP2* gena u SE regenerisanim na korenovima spanaća linije 188 određen je pomoću RT-PCR i qRT-PCR analiza. Fragmenti cDNK gena *SoRIP1* i *SoRIP2*, prvobitno su amplifikovani u PCR reakcijama, radi provere specifičnosti odabranih prajmera (Sl. 19).



**Slika 19** - Ekspresija (a) *SoRIP1* i (b) *SoRIP2* gena u SE na različitim stadijumima razvića (globularnom - glob, manjim od 2mm, između 2 i 5 mm i većim od 5 mm) indukovanih iz lateralnih korenova spanaća linije 188. K – kontrola (korišćeni su apikalni fragmenti lateralnih korenova gajeni na medijumu bez BRR), M - marker (100 bp ladder, Thermo Scientific), B – blank.

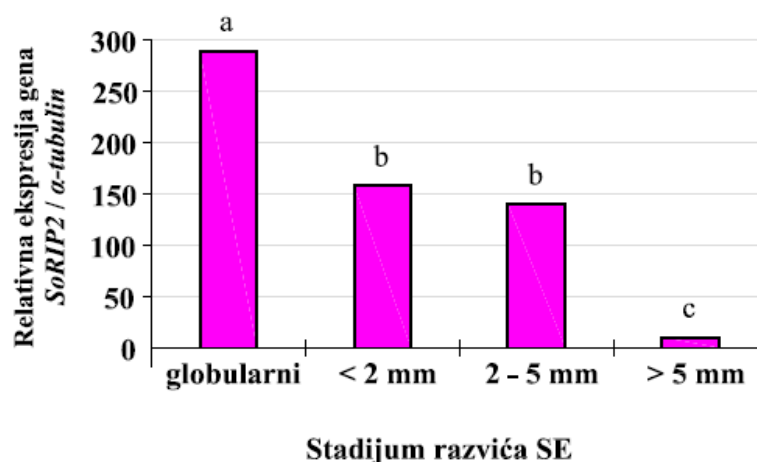
Analiza ekspresije *SoRIP1* pokazala je nespecifičnu amplifikaciju gena (Sl. 19a) pri korišćenju sva tri para testiranih prajmera i pri gradijentu temperature vezivanja prajmera u opsegu 62-67°C. Osim amplikona očekivane dužine (594 bp), dobijen je i nespecifični produkt koji je bio za oko 100 bp duži. Interesantno je da je nespecifični amplikon bio zastupljeniji u SE na starijem stupnju razvića (Sl. 19a). Očekivani i neočekivani amplikon su izolovani i eluirani sa gela, a zatim i sekvencirani. Rezultati su pokazali da je sekvenca nespecifičnog amplikona pokazivala čak 98% homologije sa sekvencom *SoRIP1* gena. Međutim, zbog nemogućnosti da se dobije amplifikacija samo ciljane specifične sekvence,

gen *SoRIP1* je isključen iz daljih istraživanja, kao nepodoban kandidat za marker-gen za praćenje somatske embriogeneze spanaća sorte "Matador". Ekspresija gena *SoRIP2* je bila specifična, kako je to pokazala RT-PCR analiza, sa dobijenim proizvodom amplifikacije dužine 629 bp (Sl. 19b), te je dalja analiza nivoa ekspresije praćena qRT-PCR metodom. Kao endogena kontrola u ovim eksperimentima je korišćen gen za  $\alpha$ -tubulin arabidopsisa, očekivane dužine amplikona od 585 bp. Efikasnost qRT-PCR reakcije, dobijena analizom standardnih krivih, je za oba gena bila zadovoljavajuća i iznosila je za 98.38% za *SoRIP2*, odnosno 102% za  $\alpha$ -tubulin. Takođe, ujednačen oblik zbirnih kriva disocijacije dobijenih produkata potvrđuju specifičnost amplifikacije za oba gena (Sl. 20a-b).



**Slika 20** – Zbirne krive topljenja produkata qRT-PCR amplifikacije (a) *SoRIP2* i (b)  $\alpha$ -tubulin gena pokazuju visoku specifičnost amplifikacije analiziranih cDNK.

qRT-PCR analiza je pokazala da je stadijum razvića statistički značajno uticao na nivo ekspresije *SoRIP2* ( $p \leq 0.001$ ). Ekspresija gena *SoRIP2* je bila 285 puta veća u SE na globularnom stupnju razvića nego u kontrolnom tkivu (korenovima gajenim na medijumu bez BRR kod kojih nije došlo do regeneracije). Kod starijih SE, koji se mogu vizuelizovati golim okom (2-5 mm), ekspresija *SoRIP2* je bila dva puta manja u odnosu na globularne SE, da bi se kod SE većih od 5 mm ekspresija *SoRIP2* vratila na nivo detektovan kod kontrole (Sl. 21).



**Slika 21** – Ekspresija *SoRIP2* gena u SE na različitim stadijumima razvića regenerisanim na korenovima spanaća linije 188. Ekspresija je analizirana metodom qRT-PCR, a kao kalibrator korišćeni su apikalni fragmenti lateralnih korenova gajeni na medijumu bez BRR. Podaci predstavljaju srednje vrednosti tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p \leq 0.05$ ) prema LSD testu.

#### 4.2.1.2. Korelacija između regenerativnog potencijala korenova klijanaca i ekspresije *SoRIP2* gena

Podobnost *SoRIP2* kao marker-gena za somatsku embriogenezu spanaća je testirana analizom korelacije između ekspresije ovog gena i regenerativnog potencijala određenog konvencionalnim brojanjem SE pomoću stereomikroskopa.

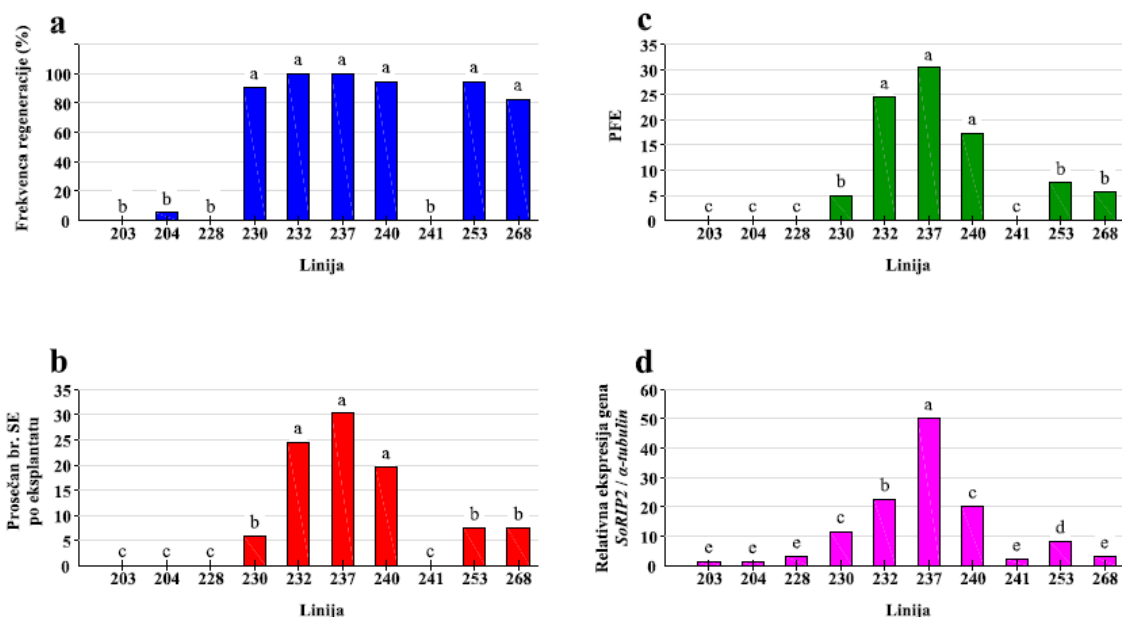
Konvencionalnim brojanjem regenerisanih SE kod 10 nasumično odabranih klijanaca utvrđeno je da je genotip statistički značajno uticao na prosečan broj SE po eksplantatu, frekvencu regeneracije i PFE indeks ( $p \leq 0.001$  za sve varijable). Sve testirane linije mogle bi se podeliti u tri grupe na osnovu dobijenog regenerativnog potencijala: linije sa izuzetno niskim (203, 204, 228 i 241), prosečnim (230, 253 i 268) i visokim (232, 237, 240) regenerativnim potencijalom (Sl. 22a-c). Najveći regenerativni potencijal je imala linija 237 sa prosečno 31.06 SE po eksplantatu, frekvencom regeneracije od 100% i PFE indeksom 31.06 (Sl. 22a-c). Kod sve tri linije kod kojih je uočen visok regenerativni odgovor PFE indeks je bio veći od 15, dok ni kod jedne linije sa prosečnim regenerativnim odgovorom PFE nije prelazio 10 (Sl. 22c). Do regeneracije uopšte nije došlo kod linija 203,



228 i 240, dok je linija 204 regenerisala niskom frekvencom regeneracije (3%) i sa prosečno 0.007 SE po eksplanatau i PFE indeksom 0.1 (Sl. 22 a-c).

Na osnovu ekspresije *SoRIP2* izdvojile su se takođe tri grupe linija, kod kojih je ekspresija bila veća u odnosu na liniju 203, korišćenu kao kalibrator zbog najnižeg nivoa ekspresije, koji se ujedno poklopio i sa najnižim zabeleženim regenerativnim potencijalom među svim linijama. Kod ostalih linija iz grupe onih sa niskim regenerativnim potencijalom, 204, 241 i 228, ekspresija *SoRIP2* gena je bila do 2.5 puta veća. Sa porastom parametara regenerativnog potencijala linija iz druge grupe, 253 i 268, zabeleženo je povećanje ekspresije *SoRIP2* gena do 10 puta. Kod linija iz grupe sa visokim regenerativnim potencijalom, 232, 237 i 240 nivo ekspresije bio više od 20 puta veći nego kod linije 203. Najznačajnije povećanje ekspresije zabeleženo je, kao i u slučaju PFE indeksa, kod linije 237 i iznosilo je 50 puta (Sl. 22d). I ovde je genotip statistički značajno uticao na nivo ekspresije *SoRIP2* ( $p \leq 0.001$ ).

Pirsonov test korelacije je pokazao visoku pozitivnu korelaciju ( $r^2=0.81$ ,  $p \leq 0.05$ ) između PFE indeksa i ekspresije *SoRIP2*, čime je potvrđeno da je *SoRIP2* dobar marker-gen za kvantifikaciju embriogenog odgovora spanaća. Važno je naglasiti da je ekspresija *SoRIP2* testirana posle 4 nedelje kultivacije na medijumu za indukciju regeneracije, pre nego što su SE bili vizuelizovani pomoću stereomikroskopa. PFE je određen na kraju perioda od 12 nedelja kultivacije na indukcionom medijumu, tj. 8 nedelja posle analize ekspresije *SoRIP2*.



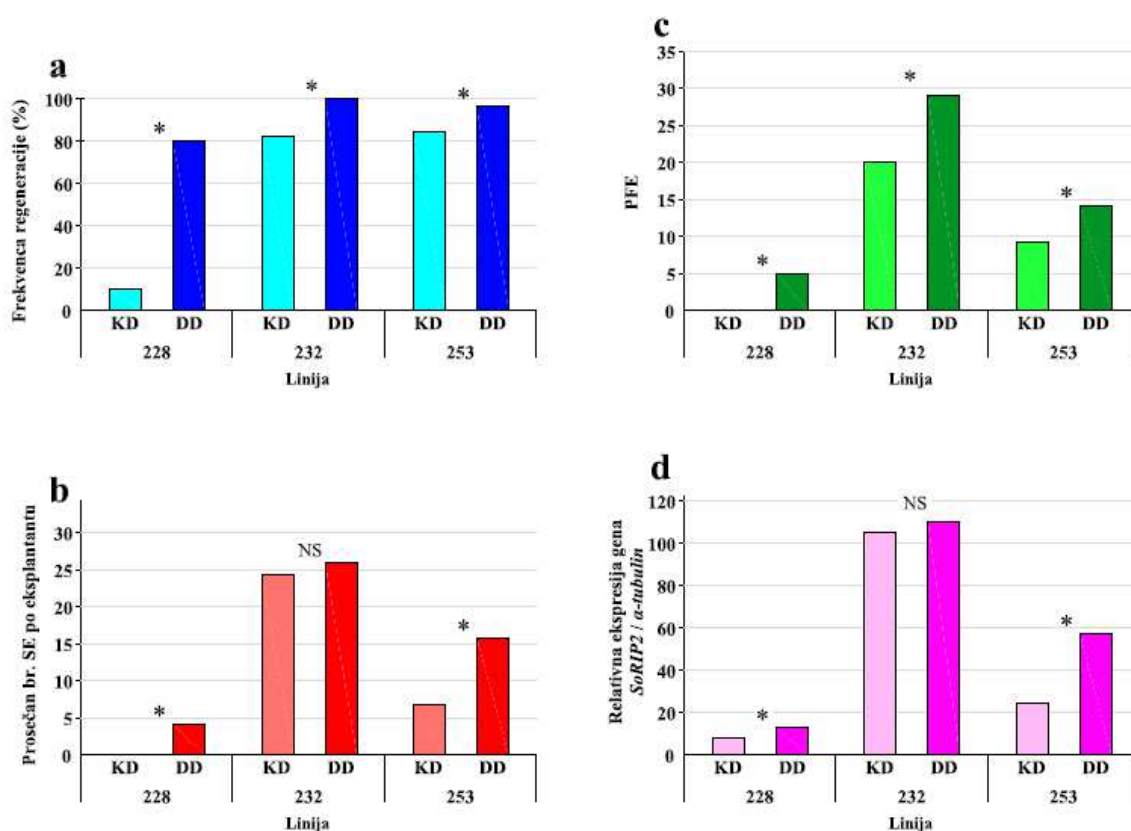
**Slika 22** – Poređenje regenerativnog potencijala apikalnih odsečaka lateralnih korenova izolovanih sa 10 nasumično odabranih klijanaca spanaća, gajenih na medijumu za indukciju regeneracije tokom 12 nedelja i ekspresije *SoRIP2* gena u eksplantatima ovih linija posle 4 nedelje kultivacije na medijumu za indukciju regeneracije. (a) Frekvencija regeneracije. (b) Prosečan broj SE po eksplantatu. (c) Potencijal za formiranje somatskih embriona (PFE). (d) Ekspresija *SoRIP2* gena. Podaci predstavljaju srednje vrednosti. Za svaku liniju je postavljeno po 5 Petri kutija sa po 4 fragmenta korenova ( $n=20$ ). Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ( $p \leq 0.05$ ) prema LSD testu.

#### 4.2.1.3. Uticaj fotoperioda na ekspresiju *SoRIP2* gena

Uticaj fotoperioda (KD/DD) na ekspresiju gena *SoRIP2* testiran je u apikalnim fragmentima lateralnih korenova tri linije regeneranata spanaća za koje je u prethodnom eksperimentu pokazano da se odlikuju različitim regenerativnim kapacitetom. Linija 228 je imala nizak, linija 253 prosečan i linija 232 izuzetno dobar regenerativni potencijal (Sl. 22c). Konvencionalnim brojanjem pokazano je da je fotoperiod značajno uticao na somatsku embriogenezu koja je bila efikasnija u uslovima DD kod svih testiranih linija (Sl. 23a-c). Kod sve tri testiranje linije u uslovima DD je došlo do statistički značajnog povećanja frekvence regeneracije ( $p \leq 0.05$ ). Ova razlika ostala je značajna i za ostala dva parametra regeneracije, srednji broj SE i PFE, kod linija 228 i 253. Iako je kod linije 232 frekvencija regeneracije bila veća u uslovima DD za oko 20% u odnosu na KD, fotoperiod nije statistički značajno uticao na razliku u broju SE po eksplantatu i PFE indeks ( $p=0.44$ ).

Analiza ekspresije gena *SoRIP2* u eksplantatima gajenim u uslovima DD pokazala je da je odnos nivoa ekspresije zabeležen u korenovima regeneranata tri testirane linije odgovarao odnosu nivoa ekspresije u korenovima klijanaca (Sl. 22d i Sl. 23d). Na ekspresiju *SoRIP2* statistički značajno su uticali genotip ( $p \leq 0.001$ ), fotoperiod ( $p \leq 0.05$ ), kao i njihova interakcija ( $p \leq 0.001$ ). Povećanje ekspresije *SoRIP2* gena kod linije 232 sa izuzetno dobrim regenerativnim potencijalom je bilo približno u uslovima KD i DD. Ekspresija *SoRIP2* gena u korenovima ove linije je bila oko 100 puta veća na indukcionom medijumu u odnosu na medijum bez regulatora rastenja BRR u uslovima oba svetlosna režima (Sl. 23d). Kod korenova linija sa niskim (228) i srednje uspešnim regenerativnim potencijalom (253) ekspresija gena *SoRIP2* je bila 2, odnosno 2.5 puta veća u uslovima DD nego KD (Sl. 23d). Kod linije 228 ekspresija ovog gena u uslovima DD je bila veća oko 15 puta, a kod linije 253 u istim uslovima ekspresija je bila veća oko 60 puta u odnosu na kontrolne korenove sa neindukcionog medijuma (Sl. 23d).

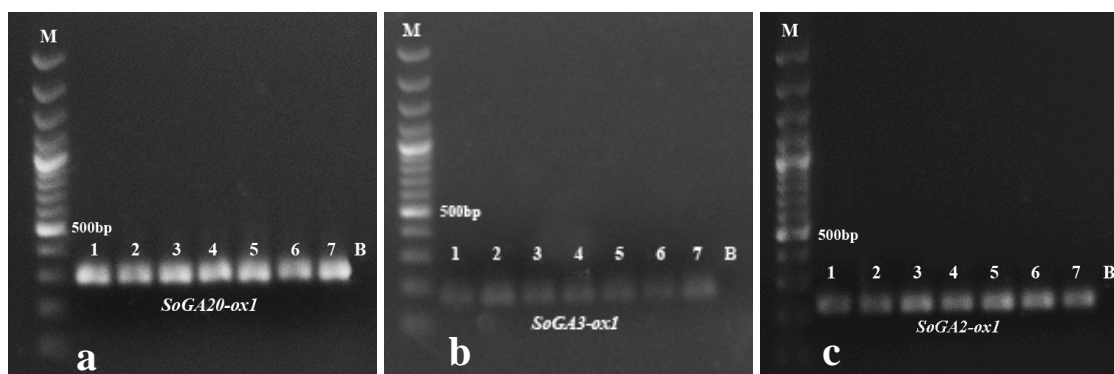
Pirsonov test korelacije je pokazao visoku pozitivnu korelaciju ( $r^2=0.92$ ) između PFE indeksa i povećanja ekspresije *SoRIP2* kod testiranih linija na odgovarajućem fotoperiodu.



**Slika 23** – Regenerativni potencijal apikalnih odsečaka korenova izolovanih sa regeneranata tri linije (228, 232 i 253) spanaća. Korenovi su gajeni na indukcionom medijumu u uslovima DD i KD. (a) Frekvencija regeneracije. (b) Prosečan broj SE po eksplantatu. (c) Potencijal za formiranje embriona (PFE). (d) Ekspresija *SoRIP2* gena. Podaci predstavljaju srednje vrednosti. Četri Petri kutije sa po 5 korenskih fragmenata ( $n=20$ ) je korišćeno za svaki tretman i za svaku liniju. Tretmani KD i DD za istu liniju su upoređivani t-testom za zavisne uzorke. DD - dugi dan. KD - kratak dan, NS - statistički neznačajno različito, \* - statistički značajno različito za  $p \leq 0.05$ .

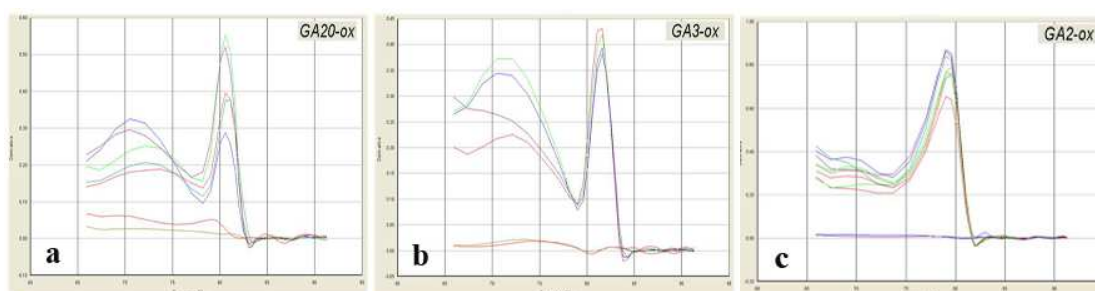
#### 4.2.2. Ekspresija ključnih gena za metabolizam giberelina u apikalnim fragmentima lateralnih korenova

Analiza ekspresije ključnih gena za metabolizam bioaktivnih giberelina u korenovima 7 nasumično izabranih linija regeneranata gajenih na medijumu za indukciju regeneracije tokom 4 nedelje u uslovima DD pokazala je da je amplifikacija *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1* specifična (Sl. 24).



**Slika 24** – Specifična amplifikacija gena: (a) *SoGA20-ox1*, (b) *SoGA3-ox1* i (c) *SoGA2-ox1* praćena u apikalnim fragmenata lateralnih korenova izolovanih sa regeneranata 7 nasumično izabranih linija (brojevi 1-7) spanaća gajenih na medijumu za indukciju regeneracije. M - marker (100bp, Thermo Scientific), B - blank.

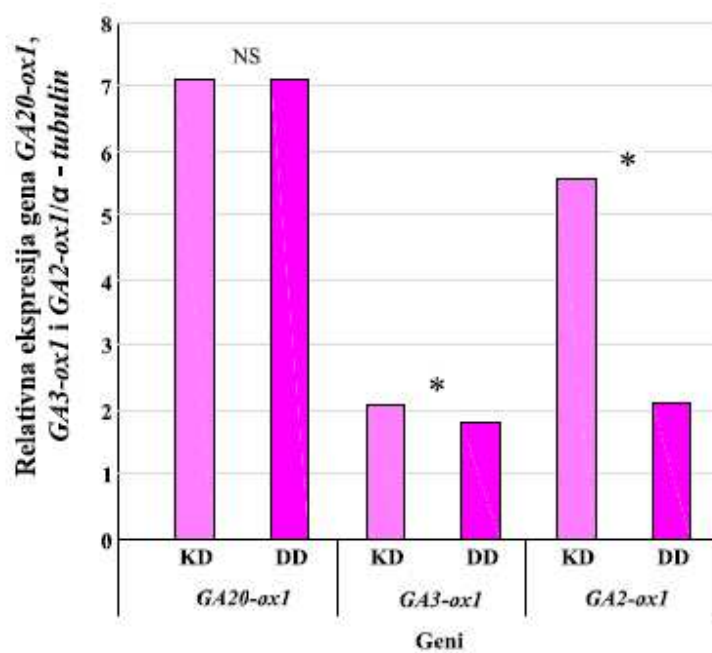
Proverom specifičnosti amplifikacije za sva tri amplikona u qRT-PCR reakcijama dobijena je zadovoljavajuća efikasnost koja je iznosila 108.8%, 97.2% i 94.9% za *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1*, odnosno *SoGA2-ox1* (Sl. 25a-c). Ekspresija u negativnoj kontroli (identična smeša bez reverzne transkripcije) nije detektovana čime je pokazano da u sistemu nema genomske DNK. Takođe, ujednačen oblik zbirnih kriva disocijacije dobijenih produkata potvrđuju specifičnost amplifikacije za sva tri gena (Sl. 25a-c).



**Slika 25** – Zbirne krive topljenja produkata qPCR amplifikacije (a) *SoGA20-ox*, (b) *SoGA3-ox1* i (c) *SoGA2-ox1* gena pokazuju visok u specifičnost amplifikacije cDNK kod apikalnih odsečaka lateralnih korenova spanaća.

#### 4.2.2.1. Uticaj fotoperioda na ekspresiju *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1*

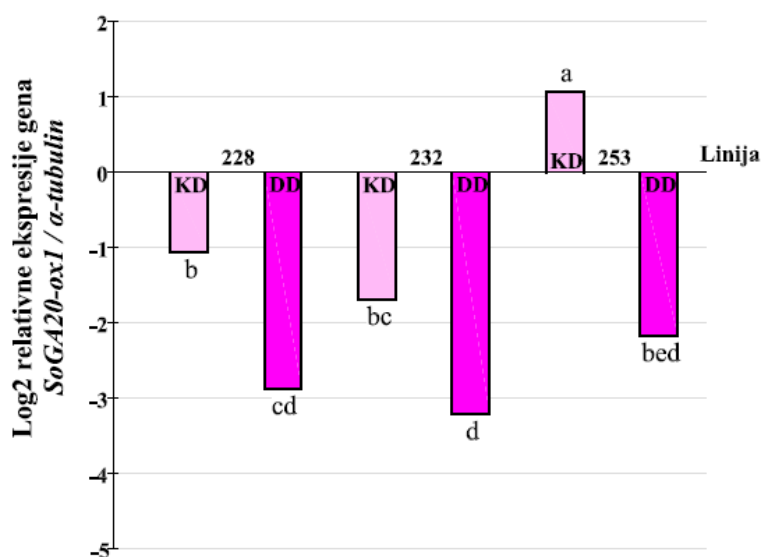
Analiza uticaja fotoperioda na gene uključene u metabolizam giberelina pokazala je da ekspresija *SoGA20-ox1* nije bila statistički značajno različita u uslovima KD i DD ( $p=0.9$ ) i bila je oko 7 puta veća nego u mraku, dok je ekspresija *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1* bila statistički značajno veća u uslovima KD nego u uslovima DD ( $p\leq 0.05$ ) (Sl. 26). Ekspresija *SoGA3-ox1* je bila 2.2 puta veća u uslovima KD i 1.8 puta veća u uslovima DD nego u mraku (Sl. 26). Ekspresija *SoGA2-ox1* je bila 5.5 puta veća u uslovima KD nego u mraku, dok je njegova ekspresija u uslovima DD bila 2 puta veća nego u mraku (Sl. 26).



**Slika 26** – Ekspresija *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1* u apikalnim fragmentima korenova izolovanim sa regeneranata Inije 253 i gajenim tokom 4 nedelje na medijumu bez BRR u uslovima KD i DD. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za  $\alpha$ -tubulin. Podaci predstavljaju srednje vrednosti. Tretmani KD i DD su upoređivani t-testom za zavisne uzorke. NS - statistički neznačajno različito, \* - statistički značajno različito za  $p\leq 0.05$ .

#### 4.2.2.2. Uticaj egzogenih giberelina na ekspresiju *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1*

Na ekspresiju *SoGA20-ox1* u korenovima spanača tri linije sa različitim regenerativnim potencijalom, gajenim na medijumu za indukciju regeneracije (NAA 20  $\mu$ M + GA<sub>3</sub> 5  $\mu$ M), statistički značajno su uticali genotip ( $p \leq 0.001$ ), fotoperiod ( $p \leq 0.001$ ), kao i njihova interakcija ( $p \leq 0.05$ ). U odnosu na eksplantate gajene na medijumu bez BRR, u eksplantatima gajenim na indukcionom medijumu je detektovano smanjenje ekspresije *SoGA20-ox1* u uslovima oba fotoperioda kod linija 228 i 232. Ekspresija je bila oko 3, odnosno 6.5 puta veća u korenovima linija 228 i 232 gajenim u uslovima KD u odnosu na DD. Ekspresija *SoGA20-ox1* u korenovima linije 253 gajenim na medijumu za indukciju regeneracije u uslovima KD je bila oko 2.5 puta veća u odnosu na ekspresiju u korenovima na medijumu bez BRR gajenim na istom fotoperiodu. Suprotno tome, ekspresija *SoGA20-ox1* u uslovima KD je bila oko 6 puta manja na indukcionom medijumu nego na medijumu bez BRR (Sl. 27).

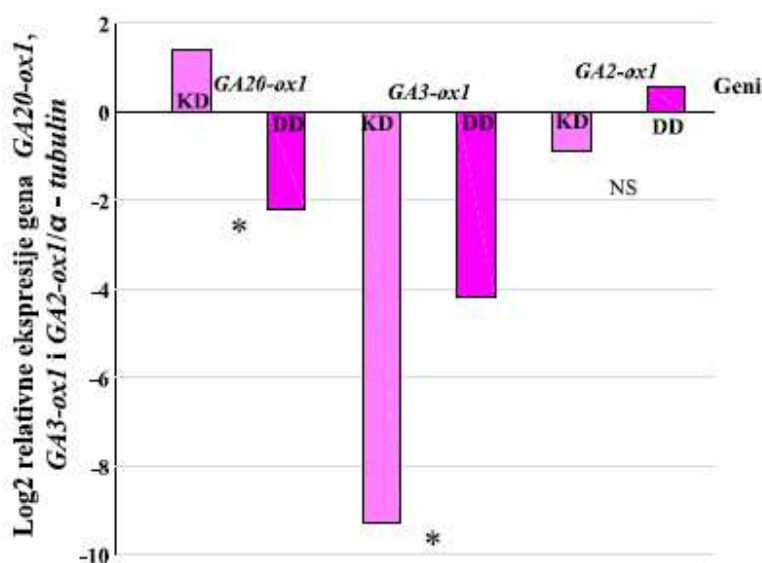


**Slika 27** – Ekspresiji *SoGA20-ox1* određena metodom qRT-PCR u apikalnim fragmentima korenova izolovanim sa biljaka linija 228, 232 i 238 i gajenim tokom 4 nedelje na medijumu za indukciju regeneracije u uslovima KD i DD. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za  $\alpha$ -tubulin. KD - kratak dan, DD - dugi dan.

Ekspresija *SoGA20-ox1* testirana u fragmentima korenova tri linije spanaća (228, 232 i 253) gajenih na medijumu za indukciju regeneracije, u uslovima KD i DD, i ekspresija *SoRIP2* kod istih linija i na istim tretmanima ne pokazuju statistički značajan stepen korelacije ( $r^2=0.17$ ).

Dodatne analize ekspresije sva tri gena u odseccima korenova linije 253, sa srednje visokim regenerativnim potencijalom i najvećim zabeleženim promenama u ekspresiji *SoGA20ox-1*, pokazale su da je ekspresija *SoGA3-ox1* u korenovima na medijumu za indukciju regeneracije je bila oko 20 puta niža u uslovima DD i 500 puta niža u uslovima KD nego u korenovima gajenim na medijumu bez BRR (Sl. 28).

Ekspresija *SoGA2-ox1*, u korenovima gajenim na medijumu za indukciju regeneracije, je bila veća 1.5 puta u odnosu na kalibrator u uslovima DD i manja oko 2 puta u odnosu na kalibrator u uslovima KD (Sl. 28).



**Slika 28** –Ekspresija *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1* određena metodom qRT-PCR u apikalnim fragmentima korenova izolovanim sa biljaka linije 253 i gajenim tokom 4 nedelje na medijumu za indukciju regeneracije u uslovima KD i DD. KD - kratak dan, DD – dugi dan.



## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Regenerativni potencijal korenova spanaća

#### 5.1.1. Procedura za regeneraciju

U ovom radu, somatska embriogeneza je indukovana iz fragmenata korenova spanaća sorte "Matador" po proceduri Knoll *et al.* (1997), uz modifikaciju koja se odnosi na biljni materijal. I pored toga što su u ovom radu i radu Knoll *et al.* (1997) za indukciju regeneracije korišćeni isti BRR i isti tip eksplantata, dobijeni su značajno različiti rezultati. Dok su u eksperimentima Knoll *et al.* (1997) iz fragmenata korenova indukovani pupoljci direktnom organogenezom iz epidermalnih i subepidermalnih ćelija korena, u ovom radu dobijena je indirektna somatska embriogeneza. Interesantno je da su u trećoj studiji Komai *et al.* (1996a) indukovali regeneraciju somatskih embriona iz odsečaka korenova spanaća istim BRR u nešto nižoj koncentraciji (10  $\mu\text{M}$  NAA + 0.1  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub>). U studiji Komai *et al.* (1996a) somatskoj embriogenezi je prethodilo formiranje masivnih kalusa, dok je u ovom radu dobijena samo vrlo ograničena proliferacija ćelija korena.

Razlike u morfogenetskim putevima u sve tri studije mogu se objasniti različitom genetičkom osnovom biljnog materijala koji je korišćen u eksperimentima jer je u svakoj studiji korišćena druga sorta spanaća.

Sorta "Matador", korišćena u ovom radu, tokom niza godina smatrana je sortom koju je teško regenerisati *in vitro* (Nešković & Radojević, 1973; Zdravković-Korać & Nešković, 1998, 1999). Regenerativni potencijal sorte "Matador" značajno je bio manji od regenerativnog potencijala sorti "Longstanding" (Knoll *et al.*, 1997), "Jiromaru" i "Nippon" (Komai *et al.*, 1996a). Pažljiv izbor eksplantata i bolje optimizovana kombinacija BRR, koji su korišćeni u okviru ove disertacije, omogućili su povećanje regenerativnog potencijala sorte "Matador". To je u skladu sa opšte prihvaćenim stavom da je potencijal za somatsku embriogenezu široko rasprostranjena osobina biljnih tkiva, ali da je teško pronaći uslove pod kojim se on eksprimira (von Arnold *et al.*, 2002; Feher, 2008).

### 5.1.2. Regenerativni potencijal P-klijanaca

Pod optimalnim uslovima, tokom perioda od 8 nedelja, u ovoj studiji je regenerisalo svega 20 od testiranih 30 linija sorte "Matador", dok je za isti vremenski period pod sličnim eksperimentalnim uslovima regenerisalo 28 od testiranih 30 linija sorte "Nippon" (Ishizaki *et al.*, 2001). Čak i posle dodatnog perioda subkultivacije u trajanju od 4 nedelje, svega 4 genotipa sorte "Matador" su pokazala visoku frekvencu regeneracije (85-100%), mada sa relativno niskim prosečnim brojem SE po eksplantatu (6.96-9.96). Generalno gledano, kod najvećeg broja linija je dobijeno ukupno 10-30 SE tokom celokupnog trajanja eksperimenta (12 nedelja).

Važno je istaći činjenicu da je praćenjem regenerativnog potencijala P klijanaca utvrđeno da je samo linija P18 regenerisala u toku prve subkulture, pa se samim tim period pouzdane selekcije linije sa dobrim regenerativnim potencijalom produžava na minimum 6-8 nedelja.

Na osnovu izloženog se može zaključiti da je regenerativni potencijal sorte "Matador" nizak zato što su jedinke sa visokim regenerativnim potencijalom izuzetno retke u populacijama ove sorte. To nije iznenađujuće, s obzirom da ova osobina u prirodnim uslovima nije pod selektivnim pritiskom. S obzirom na to i činjenicu da je generalno mali broj biljnih ćelija kompetentan za genetičku transformaciju, za oplemenjivanje sorte "Matador" modernim metodama biotehnologije neophodno je razviti nov, efikasan i pouzdan sistem za regeneraciju.

### 5.1.3. Formiranje semena *in vitro*

Spanać kao biljka dugog dana, veoma lako cveta ako je izložena odgovarajućim svetlosnim uslovima u kulturi *in vitro* (Ćulafić, 1973; Ćulafić & Nešković, 1980) i daje vijabilna semena (Al-Khayri *et al.*, 1992a). Semena su u ovoj studiji, kao i u eksperimentima Al-Khayri *et al.* (1992a), podvrgnuta hladnom tretmanu kako bi klijala, ali je u oba slučaja pokazano da to nije neophodno. Procenat klijanja semena dobijenih u uslovima *in vitro* (83%) nije se razlikovao od procenta klijanja komercijalno nabavljenih semena spanaća (84%). Visok procenat klijavosti semena formiranih u uslovima *in vitro* (95%) je dobijen i u radu Knoll *et al.* (1997).

Za dobijanje visoko regenerativnih linija spanaća u ovom radu je korišćeno samooplođenje u uslovima *in vitro*. Ovaj pristup ima izvesnih prednosti u odnosu na samooplođenje *ex vitro*. Prva prednost je što je u uslovima *in vitro* moguće pratiti regenerativni kapacitet roditelja i cele familije potomaka, bez opasnosti od gubitka dragocenih genotipova iz kolekcije usled neefikasne aklimatizacije biljaka na uslove *ex vitro* ili kontaminacije semena pri ponovnom uvođenju materijala u kulturu.

Drugi razlog je plastičnost u ekspresiji pola spanaća *in vitro* (Al-Khayri *et al.*, 1992a; Komai *et al.*, 1999; Komai & Masuda, 2004). Zbog plastičnosti ekspresije pola, koja podrazumeva sposobnost muških i ženskih biljaka da razviju hermafroditne cvetove i tako postanu andromonecke (linije P5 i P9), odnosno ginomonecke (linije P238, 238-6 i 238-6-3) biljke, moguće je dobiti semena samooprašivanjem originalno muških, odnosno ženskih jedinki. U prirodi postoji ginomonecizam; kod sorte "Jiromaru" do 14% inicijalno ženskih biljaka kasnije razvija hermafroditne cvetove, ali njihovim oprašivanjem *ex vitro* nastaje isključivo žensko potomstvo (Komai *et al.*, 2003). Međutim, u uslovima *in vitro*, ekspresija pola je nestabilnija i andromonecizam i ginomonecizam su daleko češće pojave (55% odnosno 64%), a time i šansa za dobijanje semena (Komai *et al.*, 2003).

Treća prednost kulture *in vitro* je u tome što je ciklus formiranja semena ubrzan. Kod biljaka dobijenih iz apeksa potomačkih S-klijanaca zapaženo je nešto ranije cvetanje ženskih biljaka, u petoj nedelji, umesto u sedmoj kao kod biljaka dobijenih iz apeksa roditeljskih P-klijanaca. U skladu s tim, počev od S<sub>1</sub> generacije, semena su se formirala već posle šest, umesto posle 8 nedelja. Drugim rečima, generacijski ciklus (od semena do semena) je trajao 6 nedelja, čime su eksperimenti bili značajno ubrzani. Slična pojava skraćanja generacijskog ciklusa u uslovima *in vitro* je uočena kod arabidopsisa (Ochatt & Sangwan, 2008), pasulja i *Vigna subterranea* (Ochatt *et al.*, 2002). Kod dva ekotipa arabidopsisa ciklus jedne generacije je sa 63-77 dana u uslovima *ex vitro* skraćen na 39-45 dana u uslovima *in vitro*. Zanimljivo je da je ciklus druge generacije gajene *in vitro* dodatno skraćen na 17-20 dana i ta osobina je ostala stabilna u toku narednih 10 generacija (Ochatt & Sangwan, 2008). Ovaj pristup je omogućio dobijanje 12-15 generacija arabidopsisa, 6 generacija pasulja i 4 generacije *Vigna subterranea* tokom godinu dana (Ochatt *et al.*, 2002, 2008).

U eksperimentima u okviru ove disertacije su posle četiri ciklusa samooplođenja sve biljke bile ženske. Najveći broj semena su proizvele tzv. prave monecke biljke, koje imaju približan broj muških i ženskih cvetova. Međutim, u populacijama sorte "Matador" broj moneckih biljaka je mali (oko 11%). Ove biljke samooplođenjem daju ženske ili monecke biljke, pa iz generacije u generaciju opada broj biljaka koje se mogu samooploditi, a time i broj semena. To važi i za prirodne populacije i upravo je to glavni razlog što se kod spanaća ne mogu dobiti prave čiste linije, koje bi se zatim koristile za dobijanje hibrida. Diecizam je značajna prepreka konvencionalnom oplemenjivanju biljaka.

### 5.1.4. Regenerativni potencijal S klijanaca

Regenerativni potencijal S linija testiranih u ovom radu je bio vrlo varijabilan (Sl.6c,f, Sl. 7c i Sl. 8c). Kod roditeljskih linija sa niskim regenerativnim potencijalom (P5 i P9), samooplođenje je rezultovalo u njegovom veoma slabom povećanju kod potomstva (Sl. 6c,f). Suprotno tome, genotipovi P18 i P238 su dali potomstvo vrlo varijabilnog regenerativnog potencijala, što ukazuje na heterozigotnost ovih linija. Kod potomstva linije 238-6 uočen je stalan porast regenerativnog potencijala (33-53 puta) sa svakim narednim ciklusom samooplođenja (Sl. 8c). Ovo se može objasniti porastom homozigotnosti faktora odgovornih za somatsku embriogenezu. Do sličnog zapažanja su došli Chen *et al.* (1987) i Rose *et al.* (1999), koji su uspeli da selekcionišu individue sa visokim regenerativnim potencijalom iz populacije jedinki sorte sa niskim regenerativnim potencijalom. Linija "Jermalong 2HA" *Medicago truncatula* je imala 500 puta veći regenerativni kapacitet od divlje linije "Jermalong" (Rose *et al.*, 1999).

Ipak, iako su neke P linije u ovom radu imale visoku frekvenciju regeneracije, ni jedna od njih nije dostigla tako izuzetan regenerativni potencijal kakav je uočen kod superiornih individua S<sub>3</sub> i S<sub>4</sub> linija. Svakako, ne može se isključiti postojanje takvih genotipova u P generaciji, ali i ako postoje oni su izuzetno retki, pa u okviru ove studije nisu uočeni. Treba naglasiti da je testiran regenerativni potencijal oko 250 P-klijanaca, u eksperimentima koji su predstavljeni u ovoj tezii i u drugim istraživanjima, ali ni jedan od tih klijanaca nije imao regenerativni potencijal sličan superiornim S<sub>4</sub> linijama.

Rezultati ove studije ukazuju da se regenerativni kapacitet P linija koje su imale visoku frekvencu embriogenog odgovora može dodatno unaprediti povećanjem prosečnog broja SE po eksplantatu. U prethodnim studijama efikasnost regeneracije iz fragmenata korenova različitih sorti spanaća je procenjena samo na osnovu frekvence regeneracije (Xiao & Branchard, 1995; Komai *et al.*, 1996a; Ishizaki *et al.*, 2001). Međutim, neki autori smatraju da su ukupan broj regeneranata ili broj regeneranata po eksplantatu informativnije veličine za procenu regenerativnog potencijala od frekvence regeneracije (Taguchi-Shiobara *et al.*, 1997; Bregitzer & Campbell, 2001). U skladu s tim, Song *et al.* (2010) su identifikovali 6 lokusa povezanih sa somatskom embriogenezom soje. Dva su bila pozitivno povezana sa frekvencom regeneracije, a ostala četiri sa brojem SE po eksplantatu. Autori su pretpostavili da je frekvencija formiranja SE kontrolisana od starane jednog ili dva gena, dok su broj SE i potencijal za formiranje SE kvantitativne osobine, čime se potvrđuje značaj praćenja ovih osobina. Tome slično, kod arabidopsisa je varijabilnost regenerativnog kapaciteta 88 ekotipova objašnjena blokadom procesa regeneracije mutacijama na 5 lokusa (Motte *et al.*, 2014).

Kod spanaća su jedino Knoll *et al.* (1997) pratili broj regeneranata po eksplantatu. Međutim, ova veličina, kao ni frekvencija regeneracije u ostalim studijama na spanaću, nije proučavana na nivou individualnog klijanca već na nivou sorte, zbog čega su dobijeni rezultati usrednjeni kao posledica mešanja individua u isti pul eksplantata. Jedini izuzetak je studija Ishizaki *et al.* (2001) u kojoj je uočena velika individualna varijabilnost u regenerativnom odgovoru spanaća. Ovaj trend u istraživanju se ne odnosi samo na spanać. Naprotiv, pri razvijanju i usavršavanju protokola za indukciju regeneracije različitih biljnih vrsta generalno se ne uzimaju u obzir jedinke, već se eksplantati nasumično biraju iz pula eksplantata. Regenerativni potencijal se obično proučava na nivou sorte. Verovatno se visoka varijabilnost rezultata, po kojoj je kultura biljnih tkiva poznata i potreba za velikim uzorkom bar delimično može objasniti nasumičnim uzorkovanjem biljnog materijala, bez obraćanja pažnje na individualnu varijabilnost.

Kod mnogih biljnih vrsta je uočena visoka varijabilnost u regenerativnom odgovoru ne samo sorti koje pripadaju istoj vrsti, već i čistih linija (Popelka & Altpeter, 2003; Ozbay & Özgen, 2010; Rakshit *et al.*, 2010; Anami *et al.*, 2010) i to važi za sve procese

regeneracije *in vitro*: formiranje embriogenog kalusa (Jia *et al.*, 2009), somatsku embriogenezu (Ishizaki *et al.*, 2001), ginogenezu (Bohanec *et al.*, 1995; Javornik *et al.*, 1998; Bohanec & Jakše, 1999), androgenezu (Li *et al.*, 2013) i kaulogenezu (Tubić *et al.*, 2014). Regenerativni potencijal je samo retko studiran na nivou individue, kao kod luka šalota (Tubić *et al.*, 2014), crnog luka (Javornik *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 1999; Bohanec & Jakše, 1999), lucerke (Chen *et al.*, 1987) i pamuka (Mishra *et al.*, 2003).

Brzina kojom eksplantati odgovaraju na indukcionu tretman je takođe genetički determinisana osobina. U ovoj studiji linije sa najvećim regenerativnim kapacitetom su regenerisale već posle četiri nedelje i ta osobina se konstantno održavala u potomstvu. Slična pojava je zapažena kod luka šalota, kod koga je takođe uočena varijabilnost u brzini kaulogenog odgovora na nivou individue (Tubić *et al.*, 2014). Tome slično, kod šargarepe je uočena značajna varijacija u brzini embriogenog odgovora mikrospora čistih linija i njihovih hibrida (Li *et al.*, 2013), a kod dva ekotipa arabidopsisa brzina kaulogenog odgovora (Zhao *et al.*, 2013).

Na osnovu izloženog se može zaključiti da se regenerativni potencijal nekih jedinki može povećati samooplođenjem i da se na taj način mogu dobiti superiorne jedinice polazeći od jedinki sa skromnim regenerativnim potencijalom. Stvaranje kolekcije superiornih genotipova omogućilo je izučavanje genetičkih osnova somatske embriogeneze kod visoko regenerativnih sorti spanaća "Nippon" (Ishizaki *et al.*, 2002) i "Jiromaru" (Kawade *et al.*, 2008) i izolaciju proteina, a zatim i kloniranje gena čija je ekspresija u korelaciji sa sticanjem kompetencije za somatsku embriogenezu (Kawade & Masuda, 2009). Osim toga, to bi bila odlična platforma za razvijanje protokola za efikasnu genetičku transformaciju, kao što je protokol za transformaciju raži značajno poboljšan upotrebom inbred linije sa superiornim *in vitro* odgovorom (Popelka & Altpeter, 2003).

### **5.1.5. Poređenje regenerativnog potencijala korenova klijanaca i regeneranata**

Uspešnost protokola za indukciju somatske embriogeneze, koji je razvijen u okviru ove disertacije, bi bila dovedena u pitanje ako se embriogeni potencijal korenova klijanaca ne bi održao i kod korenova biljaka regenerisanih iz somatskih embriona. Poređenje

embriogenog potencijala korenova klijanca i korenova izolovanih sa regeneranata iste linije je pokazalo da je njihov embriogeni potencijal približan. Zahvaljujući tome moguće je koristiti korenove visoko regenerativnih linija u daljem eksperimentalnom radu. Male razlike u embriogenom kapacitetu koje su uočene između korenova klijanaca i regeneranata se mogu pripisati različitom stadijumu razvića biljnog donor materijala i pretretmanu kome su donor biljke bile izložene. Klijanac formira dobro razvijen koren u periodu od 3 nedelje, dok je somatskim embrionima potrebno najčešće 6-8 nedelja da se razviju u biljke i da formiraju razgranat korenov sistem. Osim toga, klijanci su gajeni na medijumu bez BRR, dok su SE gajeni na medijumu sa 5  $\mu\text{M}$  KIN, što se može smatrati pretretmanom.

S obzirom na činjenicu da je stabilnost embriogenog kapaciteta biljnog materijala potvrđena i u radu Ishizaki *et al.* (2001), u kome je korišćena različita procedura za indukciju somatske embriogeneze, može se zaključiti da je embriogeni potencijal korenova klijanaca pouzdan indikator regenerativnog potencijala datog genotipa i da garantuje pouzdanost sistema za indukciju somatske embriogeneze iz korenova regeneranata tokom perioda od bar godinu dana.

#### **5.1.6. Uticaj fotoperioda na regenerativni potencijal korenova**

I pored izuzetnog uticaja koji genotip ima na regenerativni kapacitet sorte "Matador", ali i drugih biljnih vrsta, proučavanje uticaja drugih faktora, kao što je svetlost, mogu doprineti daljem poboljšanju ekspresije regenerativnog potencijala (Von Arnold *et al.*, 2002; Feher, 2008). Da bi se ispitao uticaj fotoperioda, efekat genotipa na regenerativni potencijal je morao biti eliminisan. To se postiglo tako što su apikalni fragmenti korenova istih linija gajeni paralelno u uslovima DD i KD. Regeneracija SE je bila efikasnija na eksplantatima gajenim u uslovima DD nego u uslovima KD i regeneranti su se ranije pojavljivali na DD. Suprotno, Geekiyanage *et al.* (2006) su, testirajući efikasnost regeneracije u uslovima DD ili KD i gustini fluksa 5-10  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$  ili 90-100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ , pokazali da je regeneracija iz kotiledona spanaća efikasnija u uslovima KD. Pokazali su da je uticaj fotoperioda na regeneraciju bio statistički značajan samo pri visokom intenzitetu svetlosti (90-100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ ) i da je regenerativni kapacitet kotiledona gajenih u uslovima KD bio veći nego u uslovima DD. Bez obzira što je u toj studiji korišćena druga sorta

spanaća i drugi tip eksplantata, različit zaključak je naverovatnije posledica drugačijeg uzorkovanja biljnog materijala. Autori nisu uzimali u obzir uticaj genotipa i nisu poredili genetički identičan materijal gajen u uslovima oba fotoperioda. Kad se uzme u obzir da je frekvencija regeneracije individualnih P linija u rezultatima predstavljanim u ovoj tezi varirala u opsegu od 0% do 100%, što je u skladu i sa variranjem frekvence regeneracije od 0% do 80% u radu Ishizaki *et al.* (2001), jasno je da je nasumičan izbor biljnog materijala u studiji Geekiyanage *et al.* (2006) mogao dovesti do drugačijih zaključaka.

Osim toga, ovim eksperimentom je potvrđena velika varijabilnost regenerativnog potencijala individua sorte "Matador", posebno kada je u pitanju prosečan broj SE po eksplantatu. Samo tri od 40 testiranih linija su regenerisale u toku prve subkulture (Sl. 11c), što je u skladu sa prethodnim rezultatima kada je tokom prve subkulture regenerisala samo jedna od 30 linija (Sl. 5c). Iako je regenerativni kapacitet individua u eksperimentu u kome je testiran uticaj fotoperioda bio nešto veći (Sl. 11c), nijedna testirana linija nije dostigla izuzetan regenerativni kapacitet S<sub>4</sub> linija (Sl. 8c), što je dodatna potvrda da su takve linije u prirodnim populacijama sorte "Matador" vrlo retke. Generalno, moguće je da su bolji rezultati u ovom eksperimentu dobijeni usled izlaganja eksplantata većoj gustini fluksa svetlosti od 80 - 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ , za koju se u kasnijem radu (Sl. 12a-c) i u radu Geekiyanage *et al.* (2006) ispostavilo da je bila najefikasnija u indukciji regeneracije. Studija Geekiyanage *et al.* (2006) je jedina studija u kojoj je proučavan uticaj svetlosti na regeneraciju spanaća *in vitro*.

Povećanja regenerativnog odgovora u uslovima DD se može objasniti interakcijom svetlosti i giberelina. Činjenica da je nivo GA<sub>20</sub> veći u uslovima DD nego KD (Metzger & Zeevaart, 1980) usled povećanja ekspresije gena koji kodira GA<sub>20-ox</sub> (Wu *et al.*, 1996), što vodi povećanju nivoa aktivnih endogenih giberelina (Talon *et al.*, 1991). Ishizaki *et al.* (2001) su izneli pretpostavku da se razlika u regenerativnom odgovoru između individua iste sorte spanaća verovatno može objasniti razlikom u nivou bioaktivnih endogenih GA.

Poslednjih godina su postignuti značajni rezultati u proučavanju uticaja interakcije svetlosti i GA na kontrolu morfogeneze i rasvetljavanju molekularnog mehanizma koji leži u njegovoj osnovi (De Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008; Alabadí & Blázquez, 2009; Jing *et al.*, 2013). Međutim, veza između uočenog delovanja svetlosti na morfogeni



odgovor eksplantata i molekularnog mehanizma koji ga pokreće još uvek nije sasvim razjašnjena u slučaju somatske embriogeneze.

Bertram & Lercari (2000) su utvrdili da svetlost kontroliše sposobnost za formiranje adventivnih izdanaka iz hipokotila paradajza, sugerišući ulogu fitohroma i kriptohroma u ovom procesu, ali molekularni mehanizam ovog fenomena nije objašnjen.

### **5.1.7. Uticaj intenziteta svetlosti na regenerativni potencijal korenova**

Za ispitivanje uticaja intenziteta svetlosti na indukciju regeneracije iz fragmenata korenova spanaća za sve tretmane je korišćen biljni matreijal istog genetičkog porekla. Iz tog razloga su u ovom eksperimentu korišćeni fragmenti korenova regeneranata, za koje je ranije pokazano da imaju sličan regenerativni kapacitet klijanacu od koga potiču. Tri testirane linije (110, 125 i 148) su odabrane jer su od svih dostupnih linija imale sposobnost regeneracije u mraku. Ova činjenica ukazuje da najveći broj linija ne regeneriše u odsustvu svetlosti. Iako je frekvencija regeneracije u mraku bila relativno visoka (39.5%-94.9%) (Sl. 12a), ukupan regenerativni potencijal eksplantata je bio nizak (Sl. 12c), zbog izuzetno niskog prosečnog broja SE po eksplantatu (0.65 - 3.39) (Sl. 12b). Ovaj rezultat podržava stav da je prosečan broj regeneranata po eksplantatu znatno bolji pokazatelj regenerativnog potencijala od frekvence regeneracije (Taguchi-Shiobara *et al.*, 1997; Bregitzer & Campbell, 2001).

Rezultati eksperimenta su potvrdili izuzetan značaj svetlosti za proces regeneracije somatskih embriona, ne samo u smislu trajanja perioda svetlosti, već i gustine fluksa svetlosti. Optimalna gustina fluksa svetlosti od 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$  dobijena u ovom radu je u skladu sa rezultatima Geekiyanage *et al.* (2006). Kod dve linije spanaća embriogeni potencijal je bio značajno niži pri gustini fluksa od 150  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$  (Sl. 12c). Ova pojava se može objasniti činjenicom da je svetlost ovog intenziteta mogla indukovati oksidativni stres u eksplantatima korenova koji je kasnije negativno uticao na proces somatske embriogeneze (Rossel *et al.*, 2002). Kod arabidopsisa je pokazano da čak i kratko osvetljavanje korenova u trajanju od nekoliko sekundi može izazvati oksidativni stres (Yokawa *et al.*, 2011).

### 5.1.8. Uticaj egzogenih giberelina na regenerativni potencijal korenova

Za testiranje uticaja egzogenih GA na regenerativni potencijal korenova spanaća su takođe korišćeni fragmenti korenova izolovani sa regeneranata. Odabrane su dve linije, 125 i 238-6-3-1, kao jedine koje su regenerisale na medijumu bez egzogenih GA. Najpre je testiran njihov regenerativni potencijal bez egzogenog GA, samo uz prisustvo 20  $\mu\text{M}$  NAA u medijumu. Odsečki korenova su gajeni u mraku ili u uslovima DD pri optimalnoj gustini fluksa od 100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ . U odsustvu GA i u mraku, samo je linija 125 regenerisala sa izuzetno niskim regenerativnim potencijalom (Sl. 13c) sa frekvencom regeneracije od svega 0.99% (Sl. 13a) i sa prosečno 0.008 SE po eksplantatu (Sl. 13b). Međutim, u prisustvu  $\text{GA}_3$  čak i u mraku frekvencija regeneracije je dostigla skoro 100% (Sl. 12a), sa prosečno 4 SE po eksplantatu (Sl. 12b). U uslovima DD i odsustvu  $\text{GA}_3$  frekvencija regeneracije linije 125 je iznosila oko 50% (Sl. 13a), sa prosečno 3.5 SE po eksplantatu (Sl. 13b), dok je pod optimalnim uslovima, u prisustvu  $\text{GA}_3$  i u uslovima DD, frekvenciju regeneracije dostigla 100% sa oko 30 SE po eksplantatu (Sl. 12a,b; Sl. 14a,b). Linija 238-6-3-1 je bila osetljivija od linije 125 na odsustvo  $\text{GA}_3$ , ali je trend bio isti. Ovi rezultati ukazuju da su svetlost i  $\text{GA}_3$  neophodni za ekspresiju punog regenerativnog potencijala.

U skladu sa ovim rezultatima, Ishizaki *et al.* (2001), veruju da samo linije sa visokim nivoom endogenih GA mogu da regenerišu bez prisustva egzogenih GA i da je to jedan od faktora koji utiče na individualnu varijabilnost ekspresije regenerativnog potencijala spanaća. Odsustvo svetlosti je dodatno značajno uticalo na smanjenje regenerativnog potencijala. Ovi rezultati se mogu objasniti činjenicama da su ključni stupnjevi biosinteze GA indukovani svetlošću, pri čemu je biosinteza *ent*-kaurena, prvog stabilnog specifičnog prekursora GA i  $\text{GA}_{20}$ , prekursora bioaktivnog  $\text{GA}_1$ , pojačana u uslovima DD (Zeevaart & Gage, 1993; Wu *et al.*, 1996; Lee & Zeevaart, 2002).

U daljem radu je testiran uticaj tipa i koncentracije GA na regenerativni potencijal spanaća. Testirani su  $\text{GA}_3$ , koga biljke sintetišu u veoma malim količinama i samo pod specifičnim uslovima (Silva *et al.*, 2013), i  $\text{GA}_1$ , kao bioaktivni endogeni GA spanaća (Wu *et al.*, 1996; Mac Millan, 2001). U odsustvu svetlosti i u uslovima DD, na svim testiranim koncentracijama  $\text{GA}_3$  je indukovao viši embriogeni odgovor u odnosu na  $\text{GA}_1$ , ili razlika

nije bila statistički značajno različita (Sl. 14c,f). Sagledavajući obe linije, koncentracija 5 $\mu$ M GA<sub>3</sub> se pokazala kao optimalna, što je u saglasnosti sa rezultatima Knoll *et al.* (1997).

Iako mnogi autori navode da egzogeni GA nemaju efekta ili imaju inhibitorni efekat na indukciju somatske embriogeneze (Chen & Chang, 2003; Wang *et al.*, 2004; George *et al.*, 2008; Subotić *et al.*, 2009), postoje i primeri koji govore o promotivnom uticaju GA na somatsku embriogenezu (Konowicz & Janick, 1984; Čulafić *et al.*, 1987; Rudus *et al.*, 2002; Thomas, 2006). Kod *Foeniculum vulgare*, egzogeni GA<sub>3</sub> ne samo da je povećao efikasnost somatske embriogeneze, već je pozitivno uticao i na dalje razviće SE (Hunault & Maatar, 1995). U vezi s tim, neki autori smatraju da endogeni nivo GA nije dovoljan za izduživanje SE, pa je zato neophodan egzogeni GA (Hays *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2008b). Ipak, izgleda da u literaturi nema sličnih primera spanaću, kod koga je prisustvo GA neophodno za efikasnu indukciju somatske embriogeneze. Pojedine linije (kao što su u ovom slučaju 125 i 238-6-3-1) mogu regenerisati bez egzogenih GA, ali je izvesno da su GA neophodni za pouzdanu i efikasnu indukciju somatske embriogeneze čak i kod ovih superiornih linija.

#### **5.1.9. Uticaj higromicina na regenerativni potencijal korenova**

Pri pokušaju primene protokola koji je razvijen u ovom radu za regeneraciju SE, uočen je stimulativni efekat niske doze hyg (0.5 mg/l) na indukciju somatske embriogeneze iz odsečaka korenova spanaća (Sl.16). Mehanizam kojim hyg stimuliše somatsku embriogenezu nije poznat. Verovatno niske doze hyg deluju kao subletalni stresni faktor. U literaturi je poznato da subletalni stres može doprineti indukciji somatske embriogeneze kad su drugi faktori prisutni na suboptimalnom nivou (Pasternak *et al.*, 2002) ili može, kao i okviru rezultata dobijenih u ovoj tezi, dodatno stimulisati proces somatske embriogeneze. Ova činjenica je u skladu i sa zapažanjem da je samo vrlo niska doza hyg bila efikasna, iako i mnogo veće doze hyg nisu bile letalne za ćelije korenova spanaća, s obzirom da je proliferacija ćelija korenova bila prisutna i do 10 mg/l hyg. Zahvaljujući ovoj pojavi, koja se označava kao hormoneza, moguće je dodatno povećati regenerativni potencijal korenova spanaća, što je od izuzetnog značaja za oplemenjivanje ove vrste metodama genetičkog inženjerstva.

Pozitivan efekat hyg na proces regeneracije kod spanaća u saglasnosti je sa rezultatima Park *et al.* (1995) i Aoshima (2005), koji su uočili sličan fenomen kod krompira i čaja. Kod krompira je niska doza hyg (1 mg/l) stimulisala formiranje adventivnih pupoljaka iz odsečaka listova (Park *et al.*, 1995), dok je kod čaja znatno veća doza hyg (5-10 mg/l) promovisala formiranje adventivnih pupoljaka iz kalusa (Aoshima, 2005). Za razliku od odsečaka korenova, koji su se pokazali osetljivijim prema hyg, regenerisani primarni SE su bili manje osetljivi i formirali su SSE i pri koncentraciji hyg koja je bila letalna za ćelije korenova. To se može objasniti različitom osetljivošću tkiva ova dva tipa eksplantata prema hyg, što je u saglasnosti sa rezultatima Meng *et al.* (2007), koji su uočili varijabilan regenerativni odgovor tkiva pamuka u prisustvu hyg. Grupacije ćelija, kao što su kalusi ili masa proembrionalnih globula, su tolerantniji prema antibioticima od izolovanih SE ili nežnih organa poput korenova (Zang *et al.*, 2001; Palomo-Ríos *et al.*, 2012). Kod spanaća su masivni kalusi indukovani iz listova bili tolerantniji prema hyg (Chin *et al.*, 2009) od korenova spanaća testiranih u eksperimentima u okviru ove teze.

U drugim studijama je pokazano da direktna selekcija genetički transformisanih ćelija (na selektivnoj dozi antibiotika) može inhibirati njihovu kasniju regeneraciju (Boszoradova *et al.*, 2011; Abou-Alaiwi *et al.*, 2012), verovatno delujući kao supraoptimalni stresni faktor. Promovišući efekat niskih doza hyg se može iskoristiti za indukciju somatske embriogeneze iz transformisanih ćelija spanaća postupnom selekcijom, kao kod orhideje (Suwanaketchanatit *et al.*, 2007), zvezdana (Nikolić *et al.*, 2007), pamuka (Meng *et al.*, 2007), vinove loze (Fan *et al.*, 2008) i uljane repice (Liu *et al.*, 2011).

### 5.2. Ekspresija *SoRIP2* tokom somatske embriogeneze

Pri uspostavljanju model-sistema za praćenje somatske embriogeneze spanaća, koji je podrazumevao gajenje apikalnih odsečaka lateralnih korenova, naišlo se na niz poteškoća koje je trebalo rešiti. Jedno od zapažanja odnosilo se i na dužinu vremenskog perioda neophodnog za regeneraciju SE. Naime, uočeno je da je samo mali broj linija spanaća regenerisao SE u toku prve subkulture, odnosno nakon 4 nedelje gajenja na medijumu za indukciju regeneracije. Većina linija je odgovorila na induktivni tretman u periodu između šeste i osme nedelje kultivacije. S obzirom na ustanovljenu činjenicu da regenerativni

potencijal spanaća opada sa vremenom, i da je čak i kod superiornih linija stabilan i na maksimalnom nivou tokom najviše dve-tri godine, potrebno je bilo skratiti vreme neophodno za pouzdanu selekciju linija sa dobrim regenerativnim potencijalom. I samo brojanje regenerisanih SE radi dobijanja parametara koji će ukazati na efikasnost regeneracije testirane linije, predstavlja veoma dugotrajan i naporan postupak. Stoga je identifikacija gena čije će promene u ekspresiji korelirati sa događajima karakterističnim za rane faze somatske embriogeneze, bila od velikog značaja za unapređivanje sistema.

Od dva klonirana gena spanaća, čija je ekspresija koincidirala sa sticanjem kompetencije za somatsku embriogenezu, gen *SoRIP1* je posle analize uzvodnog promotorskog regiona smatran pogodnijim markerom za ranu detekciju embriogenih ćelija tokom procesa somatske embriogeneze (Kawade & Masuda, 2009). U promotorskom regionu ovog gena prisutan je RY motiv, koji se javlja u promotorima gena koji su aktivni tokom faze sazrevanja embriona (Braybrook *et al.*, 2006). Za ovaj element se vezuju transkripcioni faktori LEC2 i WUS, koji mogu da indukuju somatsku embriogenezu (Zuo *et al.*, 2002; Braybrook *et al.*, 2006). Nasuprot tome, u promotorskom regionu *SoRIP2* nisu detektovani slični regulatorni elementi.

Kawade i Masuda (2009) su pokazali da se tokom indukcije i razvića SE *SoRIP1* ekspimirao tokom dužeg vremenskog perioda (5 nedelja) nego *SoRIP2* (1 nedelja). Maksimum ekspresije *SoRIP1* je detektovan u embriogenom kalusu nedelju dana posle subkultivisanja na medijum bez BRR, dok je njegov nivo u SE bio oko 2 puta niži u odnosu na maksimum ekspresije. Maksimalna ekspresija *SoRIP2* je detektovana kao nagli skok u četvrtoj nedelji posle subkultivisanja na medijumu bez BRR. Ekspresija *SoRIP2* u SE je bila približna maksimalnoj ekspresiji. Osim toga, maksimalna ekspresija *SoRIP2* je bila veća od *SoRIP1*. U skladu s tim, i razlike u ekspresiji *SoRIP2* u tkivu pre indukcije i u embriogenom tkivu su veće, pa ih je lakše detektovati.

Analizom ekspresije *SoRIP1* u SE regenerisanim na odsečcima korenova spanaća u okviru eksperimenata urađenih u ovoj tezi, uočena je nespecifična amplifikacija nakon RT-PCR analize (Sl. 19). Pošto se nespecifična traka ne javlja nakon amplifikacije na matrici genomske DNK, može se zaključiti da se radi o visoko homologim genima ili alternativnoj obradi primarnog transkripta. Mogućnost da je nespecifična traka dobijena

amplifikacijom *SoRIP2* je isključena jer je stepen homologije između *SoRIP1* i *SoRIP2* vrlo nizak - svega 35% (Kawade *et al.*, 2008). Rezultati sekvenciranja su pokazali visok nivo homologije (98%) između specifičnog i nespecifičnog amplikona, čime je dodatno isključena mogućnost da je nespecifični amplikon *SoRIP2*. U skladu s tim, kod nekih biljnih vrsta je detektovano više visoko homologih RIP proteina, koji su smatrani izoformama (Stirpe & Barbieri, 1986). Dalja ispitivanja bi trebala da razjasne poreklo nespecifičnog amplikona. Interesantno je da prisustvo nespecifičnog amplikona *SoRIP1* nije detektovano kod sorti "Jiromaru" (Kawade *et al.* 2008) i "Nippon" (Ishizaki *et al.*, 2002) iako su za amplifikaciju korišćeni isti prajmeri kao u ovoj tezi. Nespecifična amplifikacija je isključila dalje ispitivanje ekspresije *SoRIP1* kao kandidata za marker za praćenje somatske embriogeneze spanaća.

Testiranje ekspresije *SoRIP2* je vršeno na nasumično odabranoj liniji (188) koja je imala dobar regenerativni potencijal. Ekspresija *SoRIP2* je analizirana nakon 4 nedelje gajenja eksplantata na medijumu za indukciju regeneracije, pre pojave vidljivih SE kod većine linija, kao i u izolovanim SE na različitim stadijumima razvića. Ekspresija *SoRIP2* u eksplantatima korenova sa globularnim SE je bila oko 300 puta veća u odnosu na fragmente korenova gajene tokom istog vremenskog perioda na medijumu bez BRR (Sl. 21). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Kawade *et al.* (2008), koji su detektovali povećanje ekspresije *SoRIP2* od 440 puta u SE izolovanim sa embriogenog kalusa 4 nedelje nakon prebacivanja na medijum bez BRR u odnosu na ekspresiju u embriogenom kalusu. (U studiji Kawade *et al.* (2008) se ne navodi stadijum razvića SE u kojima je analizirana ekspresija *SoRIP2*). Sa daljim razvićem SE regenerisanim na odsečcima korenova spanaća nivo ekspresije *SoRIP2* je drastično opao i na kotiledonarnom stupnju, kada su SE bili veći od 5mm, ekspresija je bila na nivou kontrolnih fragmenata korenova gajenih na medijumu bez BRR, kod kojih nije indukovana regeneracija SE (Sl. 21). U organima odrasle biljke detektovan je vrlo nizak nivo ekspresije *SoRIP2* (Kawade *et al.*, 2008).

Lokalizacija *SoRIP2* u epidermisu somatskih embriona ukazuje da ovaj protein verovatno ima ulogu u zaštiti od patogena, kao i u slučaju betavulgarina, ortologa *SoRIP2*, koji je detektovan u apoplastu biljaka šećerne repe zaraženih virusom (Iglesias *et al.*, 2005).

U SE arabidopsisa i šargarepe transkripti *LEC1*, odnosno *C-LEC1*, su lokalizovani na periferiji globularnih, srcolikih i torpedo embriona (Lotan *et al.*, 1998; Yazawa *et al.*, 2004), što u potpunosti odgovara lokalizaciji *SoRIP2*, pa su Kawade *et al.* (2008) pretpostavili da bi *LEC1* mogao da reguliše ekspresiju *SoRIP2*. Na ovaj način, bila bi objašnjena spona koja povezuje ekspresiju *SoRIP2* gena i ranih faza somatske embriogeneze spanaća.

Za praćenje ekspresije *SoRIP2* su odabrane po tri linije sa srednjim i visokim regenerativnim potencijalom i 4 nasumično odabrane linije sa niskim regenerativnim potencijalom. Rezultati qRT-PCR analiza su pokazali da je nivo ekspresije *SoRIP2* u SE uzorkovanim nakon 4 nedelje u visokom stepenu pozitivno korelirao sa regenerativnim potencijalom određenim konvencionalnim brojanjem nakon 12 nedelja (Sl. 22c,d).

Prethodno je pokazano da fotoperiod ima veliki uticaj na embriogeni potencijal korenova spanaća i da je regeneracija SE bila efikasnija na eksplantatima gajenim u uslovima DD nego u uslovima KD. Takođe, veoma značajno je i to što su se regeneranti ranije pojavljivali na DD. S obzirom na još uvek nerazjašnjene mehanizme kontrole ekspresije RIP gena kod spanaća, neophodno je bilo utvrditi da li i na koji način fotoperiod utiče na ekspresiju potencijalnog marker-gena. Za potrebe testiranja uticaja fotoperioda na ekspresiju *SoRIP2* korišćeni su korenovi biljaka regenerisanih iz somatskih embriona. Izabrane su tri linije sa proverenim regenerativnim kapacitetom: niskim (228), umerenim (253) i visokim (232). Razlika u nivou ekspresije *SoRIP2* između ove tri linije odgovarala je u potpunosti odnosu njihovih embriogenih potencijala. Međutim, iako je korelaciona analiza pokazala visok indeks korelacije ( $r^2=0.92$ ) između konvencionalnom metodom određenog regenerativnog potencijala i nivoa ekspresije *SoRIP2*, u slučaju linije sa visokim regenerativnim potencijalom (232) je uočeno odstupanje između konvencionalne procene regenerativnog potencijala i nivoa ekspresije *SoRIP2*. Ovo odstupanje se može objasniti činjenicom da linije sa visokim regenerativnim potencijalom efikasno regenerišu SE i pod nepovoljnim uslovima, kao što je KD. Takođe, u ranijim eksperimentima je pokazano je da je u globularnim embrionima ekspresija *SoRIP2* dva ili više puta veća nego u starijim SE. Kod linija sa visokim regenerativnim potencijalom razlike u broju SE u uslovima DD i KD nisu velike tokom 3 subkulture (12 nedelja), ali je činjenica da proces počinje ranije na DD.

Međutim, u momentu uzorkovanja materijala za ekstrakciju RNK nakon 4 nedelje, proces somatske embriogeneze je tek započeo u eksplantatima gajenim u uslovima KD, pa je na eksplantatima verovatno bilo više globularnih SE. U uslovima DD proces je već bio odmakao, pa je bilo i starijih formi, u kojima je ekspresija *SoRIP2* niža i ta činjenica je uticala na smanjenje ukupnog nivoa ekspresije *SoRIP2*. Na osnovu ovog saznanja, u budućim eksperimentima trebalo bi skratiti vreme uzorkovanja na 2 ili 3 nedelje tokom kojih se dinamika procesa regeneracije u uslovima DD i KD razlikuje u značajnijoj meri.

Kawade i Masuda (2009) su pokazali da se u promotorskim sekvencama *SoRIP1* i *SoRIP2* nalazi nekoliko *cis* elemenata za koje se smatra da kontrolišu neke faze razvića, ali i odgovor na svetlost i cirkadijalnu ritmičnost. Za sada ne postoje literaturni podaci na koji način svetlost utiče na ekspresiju ovih gena.

Ovim i prethodnim eksperimentima je pokazano da se *SoRIP2* može koristiti kao marker-gen za procenu somatske embriogeneze. Ipak, mora se imati na umu da *SoRIP2* nije direktno uključen u proces indukcije somatske embriogeneze, već da koincidira sa globularnom fazom razvića SE. Osim toga, ovaj gen verovatno ima i druge, još uvek nedovoljno razjašnjene funkcije. Samo za mali broj molekularnih markera do sada nije otkrivena nespecifična ekspresija, kao za *LEC* gene i *WUS* (Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015). Gen *SERK* je dugo smatran specifičnim markerom za somatsku embriogenezu, međutim, kasnije je otkriveno da se on ekspimiru u značajnom broju tkiva i tokom više fizioloških procesa (Hu *et al.* 2005; Sharma *et al.*, 2008a; Nolan *et al.*, 2009). Ekspresija *AGL15* takođe nije specifična za SE, pošto ovaj gen ima značajnu ulogu i u kontroli cvetanja (Adamczyk *et al.*, 2007), ali je njegov nivo u drugim tkivima veoma nizak (Perry *et al.*, 1996). I pored toga, ovi geni se uspešno koriste kao markeri somatske embriogeneze.

Bez obzira na prethodno publikovane rezultate, kao i činjenice vezane za strukturu i indukciju regulatornog dela *SoRIP1*, koji navode na zaključak da bi ovaj gen bio bolji marker, *SoRIP2* se pokazao kao potencijalno dobar marker za proces regeneracije SE kod spanaća. Linije sa dobrim regenerativnim potencijalom su izuzetno retke i mogu se uočiti nakon 4 nedelje i bez molekularnih analiza, s' toga *SoRIP2* je koristan pre svega u odabiru linija sa prosečnim regenerativnim potencijalom koje i predstavljaju izvor materijala za eksperimente. Takođe, kako te linije imaju stabilan potencijal za regeneraciju svega godinu



dana, skaraćenje perioda za selekciju linija koje regenerišu SE od 8 nedelja je od izuzetnog značaja.

### 5.3. Interakcija svetlosti i giberelina

#### 5.3.1. Uticaj fotoperioda na ekspresiju ključnih gena za metabolizam giberelina

Kod spanaća je do sada kloniran jedan gen koji kodira *SoGA20-ox1* (Wu *et al.*, 1996), jedan *SoGA3-ox* (Lee & Zeevaart, 2002) i tri *SoGA2-ox* gena (Lee & Zeevaart, 2002; Lee & Zeevaart, 2005). Ekspresija ovih gena je analizirana u nadzemnim organima biljke (apikalnom pupoljku, mladim listovima, stablu, petiolama, muškim i ženskim cvetovima), ali ekspresija ni jednog od njih nije analizirana u korenu spanaća (Wu *et al.*, 1996; Lee & Zeevaart, 2002; 2005, 2007).

Moglo bi se pretpostaviti da je broj ovih gena u spanaću veći, jer kod drugih biljnih vrsta svaki od tri enzima kodira mala familija gena. Kod arabidopsisa *GA20-ox* kodira familija od 5 gena (Phillips *et al.*, 1995), *GA3-ox* kodira familija of 4 gena (Hedden & Phillips, 2000), a *GA2-ox* familija od 8 gena (Thomas *et al.*, 1999; Hedden & Phillips, 2000). Geni za svaki enzim se različito eksprimiraju u biljnim tkivima, kao i tokom faza životnog ciklusa i taj fenomen je povezan sa različitim funkcijama koje GA vrše u različitim tkivima tokom razvića biljnog organizma (Rieu *et al.*, 2008). Ekspresija nekih gena nije detektovana ni u jednom analiziranom tkivu (npr. *AtGA2-ox3*), pa se smatra da su pseudogeni (Thomas *et al.*, 1999), a neki geni se eksprimiraju na izuzetno niskom nivou u većini tkiva, kao *AtGA20-ox4* i *AtGA20-ox5* (Rieu *et al.*, 2008). Jedan od najilustrativnijih primera je ekspresija gena *AtGA2-ox6* arabidopsisa, koja je detektovana tokom rane embriogeneze, od stadijuma globule do ranog stadijuma torpeda, a zatim se ponovo aktivira tokom imbibicije semena, da bi 5 dana posle imbibicije ekspresija bila lokalizovana u korenu i SAM klijanca (Wang *et al.*, 2004).

U skladu sa navedenim činjenicama, u ovoj disertaciji je najpre analizirana ekspresija *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1* da bi se pokazalo da li su ovi geni aktivni u apikalnim odseccima lateralnih korenova spanaća. Detektovana je ekspresija sva tri gena

(Sl. 24), koja je bila niska u odsečcima korenova gajenim tokom 4 nedelje u mraku na medijumu bez BRR. Sličan, nizak nivo ekspresije *PsGA20-ox* je detektovan u apikalnom pupoljku i stablu etioliranih klijanaca graška gajenih u mraku (Ait-Ali *et al.*, 1999).

U rezultatima dobijenim u ovoj tezi, nivo ekspresije *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1* i *GA2-ox1* je bio veći u odsečcima korenova spanaća gajenih u uslovima DD i KD nego u odsečcima korenova gajenim u mraku (Sl. 26). Najveće povećanje ekspresije, oko 7 puta, je detektovano za *SoGA20-ox1*, dok je ekspresija *SoGA3-ox1* bila oko 2 puta veća, a ekspresija *SoGA2-ox1* od 2-5 puta veća u eksplantatima gajenim u uslovima DD/KD nego u eksplantatima gajenim u mraku. Izlaganje svetlosti je očekivano indukovalo povećanje ekspresije *SoGA20-ox1*, ali razlike u ekspresiji u uslovima DD i KD nisu bile očekivane (Sl. 26). Naime, ekspresija *SoGA20-ox1* je bila približna u eksplantatima gajenim u uslovima DD i KD. Ranije je pokazano da je ekspresija gena *GA20-ox* pod fotoperiodskom kontrolom, ne samo kod spanaća (Wu *et al.*, 1996; Lee & Zeevart, 2002, 2005, 2007), već i kod arabidopsisa (Hisamatsu *et al.*, 2005) i drugih biljnih vrsta, poput graška i krompira (Ait-Ali *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2000). Međutim, eksperimentalni podaci ukazuju da to ne važi za sva biljna tkiva; npr. u liskama spanaća ekspresija *SoGA20-ox1* je bila izuzetno niska u uslovima oba fotoperioda i tek nešto veća u uslovima DD, dok u muškim i ženskim cvetovima ekspresija *SoGA20-ox1* skoro da nije ni detektovana, pa nije bilo razlika između DD i KD (Lee & Zeevart, 2002, 2005). Čak i u mladim listovima, u kojima je ekspresija bila znatno veća nego u liskama i cvetovima, nije bilo velikih razlika u ekspresiji u uslovima DD i KD. Nije jasno zašto je u odsečcima korenova spanaća ekspresija *SoGA20-ox1* približna i za to su potrebna dalja istraživanja. Treba naglasiti da je u svim publikovanim studijama koje su razmatrane u okviru ove teze analiza ekspresije izvršena u organima koji su izolovani sa intaktnih biljaka neposredno pre analize, dok je u eksperimentima u okviru ove teze analizirana ekspresija *SoGA20-ox1* u izolovanim odsečcima korenova, koji su kao izolovani organi gajeni 4 nedelje pre analize, pa prema tome predstavlja autonomnu sposobnost izolovanog organa da eksprimira *SoGA20-ox1* i sintetiše GA. Ekspresija *SoGA20-ox1* je analizirana posle 4 nedelje zato što se ekspresija ovog gena menja u vremenu tokom adaptacije na promenu u fotoperiodu. Naime, ekspresija

*SoGA20-ox1* posle prelaska sa KD na DD raste iz dana u dan tokom perioda od bar 8 dana (Lee & Zeevaart, 2002).

Ekspresija *SoGA3-ox1* u rezultatima dobijenim u okviru ove teze je bila nešto veća u uslovima KD nego u uslovima DD. Generalno je pokazano da gen *GA3-ox* nije pod fotoperiodskom kontrolom (Hisamatsu *et al.*, 2005). Lee & Zeevaart (2002) su detektovali nešto veću ekspresiju *SoGA3-ox1* u petiolama biljaka gajenih u uslovima DD, ali to nije bio slučaj sa mladim listovima i apikalnim pupoljkom. Moguće je da ekspresiju gena *SoGA3-ox1* u korenovima kontroliše i neki drugi faktor.

Ekspresija *SoGA2-ox1* je u ovom radu bila oko 2.5 puta veća u uslovima KD nego u uslovima DD (Sl. 26). Smatra se da ekspresija *GA2-ox* takođe nije pod fotoperiodskom kontrolom. U nadzemnim organima spanaća ekspresija *SoGA2-ox1* se razlikovala u različitim organima i tkivima. U petiolama i liskama nivo ekspresije *SoGA2-ox* je rastao pri prelasku sa KD na DD, a u mladim listovima i apikalnom pupoljku je opadao (Lee & Zeevaart, 2002). Na ekspresiju *GA-2ox* utiču različiti faktori. Tokom razvića biljnog organizma GA učestvuju u realizaciji mnogih programa razvića, kao što je izduživanje i klijanje embriona, izduživanje stabla, lista i korena itd. Jedan od načina kontrole nivoa GA je pokretanje njegovog katabolizma, pa je u tkivima u kojima je potreban niži nivo GA indukovana ekspresija *GA-2ox* (Nelissen *et al.*, 2012). Na ranijim stupnjevima razvića zigotskih embriona, kad se dešavaju ćelijske deobe, potrebno je da nivo GA bude niži, pa je zato tokom ovog perioda katabolizam GA dominantan i ekspresija *AtGA2-ox6* veća (Hays *et al.*, 2002). Tada različiti regulatori transkripcije kontrolišu ekspresiju ovog gena; npr. ekspresija *AtGA2-ox6* se dešava uporedo sa akumulacijom AGL15 u nukleusu, sa maksimumom ekspresije između globularnog i ranog torpedo stupnja razvića (Perry *et al.*, 1996). Ne može se isključiti mogućnost da je statistički značajno veća ekspresija *SoGA2-ox1* u uslovima DD u istraživanjima u okviru ove teze bila posledica delovanja nekog nekontrolisanog i nepoznatog faktora stresa, pošto je poznato da biljka smanjuje nivo rasteća u stresnim uslovima stimulacijom ekspresije *GA2-ox* (Magome *et al.*, 2008; Suo *et al.*, 2012; Claeys & Inzé, 2013).

Važno je naglasiti da je povećanje nivoa ekspresije gena *SoGA20-ox1* u nadzemnim organima spanaća bilo u skladu sa povećanjem nivoa proteina *SoGA20-ox1* i sadržaja  $GA_{20}$

(Lee & Zeevart, 2007). Protein SoGA20-ox1 je detektovan u brzo-rastućim tkivima, apikalnom meristemu izdanka, primordijama lista i cveta, mladim listovima i vaskularnom tkivu, ali ne i u subapikalnom regionu u zoni izduživanja (Lee & Zeevart, 2007). U petiolama je bio lociran samo u ćelijama pratilecama floema. Prisustvo i distribucija proteina SoGA20-ox nisu analizirani u korenu spanaća (Lee & Zeevart, 2007). Ovo je u skladu sa rezultatima Nelissen *et al.* (2012), koji su pokazali da ekspresija *GA20-ox* i *GA3-ox* koincidira sa zonom deobe ćelija lista, dok je u zoni izduživanja ćelija stimulirana ekspresija *GA2-ox*.

Odsecci korenova gajeni u uslovima DD i KD su uzorkovani 4h od početka svetlosnog tretmana. Poznato je da nivo *GA20-ox* pokazuje diurnalna variranja (Jackson *et al.*, 2000; Hisamatsu *et al.*, 2005). Mada je maksimum ekspresije različit kod biljnih vrsta, u velikom broju studija je zabeležen maksimum ekspresije 3-4h od početka izlaganja svetlosti (Ait-Ali *et al.*, 1999; Hisamatsu *et al.*, 2005; Paparelli *et al.*, 2013).

Rezultati dobijeni u ovoj tezi su pokazali da se ekspresija ključnih gena za metabolizam GA povećava na svetlosti, što ukazuje na to da su izolovani odsecci korenova spanaća sposobni za percepciju svetlosti. Takođe, ekspresija ovih gena, makar i na niskom bazalnom nivou na medijumu bez BRR, ukazuje da izolovani odsecci korenova imaju autonomiju u ekspresiji GA čak i u odsustvu svetlosti i veze sa nadzemnim delom biljke. Poznato je da intaktan koren ima sposobnost percepcije svetlosti, bez obzira što se u prirodi nalazi pod zemljom (Galen *et al.*, 2007), zahvaljujući tome što se u korenu ekspimiraju PHY, CRY i PHOT receptori (Ruppel *et al.*, 2001; Mullen *et al.*, 2002; Galen *et al.*, 2007; Molas & Kiss, 2008). Međutim, sve ovo se odnosi na koren intaktnih biljaka, kod kojih PHY iz izdanka može modulirati neke fiziološke procese u korenu (Salisbury *et al.*, 2007). U literaturi nema podataka o sposobnosti percepcije svetlosti izolovanih odsečaka korenova.

### 5.3.2. Uticaj egzogenih giberelina na ekspresiju ključnih gena za metabolizam giberelina

Pošto je pokazano da su genotip, svetlost i GA ključni faktori koji deluju sinergistički na ekspresiju embriogenog potencijala, testirana je ekspresija *SoGA20-ox1* u eksplantatima gajenim na indukcionom medijumu u uslovima DD i KD kod tri izabrane linije sa različitim embriogenim potencijalom. Kod sve tri testirane linije je zabeležen pad ekspresije *GA20-ox1* i on je bio veći u eksplantatima gajenim na DD nego u eksplantatima gajenim na KD (Sl. 27). To je u skladu sa činjenicom da je *GA20-ox* pod jakom kontrolom negativne povratne sprege (Israelsson *et al.*, 2004; Radi *et al.*, 2006;). Takođe, pokazano je da je ekspresija *GA20-ox* pod fotoperiodskom kontrolom i da je veća u uslovima DD nego u uslovima KD (Wu *et al.*, 1996; Lee & Zeevaart, 2002, 2005). Inhibicija ekspresije *SoGA20-ox* se može objasniti činjenicom da je prisustvo GA<sub>3</sub> u medijumu izazvalo povećanje endogenog nivoa GA i da je zbog toga aktivirana negativna povratna sprega, koja je bila izraženija u eksplantatima gajenim u uslovima DD, u kojima je inicijalno nivo ekspresije *SoGA20-ox* bio veći (Sl. 27). Najveća inhibicija ekspresije *SoGA20-ox1* je detektovana u eksplantatima linije 232 gajenim u uslovima DD i ona koincidira sa najvećim embriogenim odgovorom. Ovaj rezultat je u skladu sa pretpostavkom Ishizaki *et al.* (2001) da se individue spanaća međusobno razlikuju po količini endogenog GA, i da ta količina pozitivno korelira sa potencijalom za formiranje somatskih embriona.

Pošto je kod linije 253 detektovana najveća razlika u ekspresiji *SoGA20-ox1* u uslovima DD i KD, testirana je ekspresija i *SoGA3-ox1* i *SoGA2-ox1* kod ove linije. Najveća inhibicija ekspresije je detektovana za gen *SoGA3-ox1* u uslovima KD (Sl. 28). Razlike u ekspresiji ovog gena u uslovima DD i KD su u korelaciji sa ekspresijom *SoGA20-ox1* i mogu se objasniti većom dostupnošću supstrata, odnosno GA<sub>20</sub>, u uslovima KD. Fotoperiod ne utiče na ekspresiju *GA3-ox1*, pa je za ekspresiju *GA3-ox1* glavni regulator trenutna količina supstrata GA<sub>20</sub> (Lee & Zeevaart, 2002, 2005). Ekspresija *SoGA2-ox1* je bila veća u uslovima DD (Sl. 28). Ekspresija *GA2-ox* takođe nije pod fotoperiodskom kontrolom i zavisi od količine supstrata, odnosno bioaktivnih GA, čiji je nivo verovatno bio veći u uslovima DD, gde je i pad ekspresije *SoGA3-ox1* bio manji. Tome slično, egzogeni GA<sub>4</sub> i GA<sub>3</sub> su indukovali ekspresiju *AtGA2-ox6* u korenu

arabidopsisa (Wang *et al.*, 2004). Takođe, pored toga što inaktivira aktivne gibereline *GA2-ox* prevodi  $GA_{20}$  u  $GA_{29}$  čime kompetira sa *GA3-ox* za supstrat (O'Neill & Ross, 2002).

Korelacija između ekspresije embriogenog potencijala i metabolizma GA je uočena i kod drugih biljnih vrsta. Kod šargarepe je pokazano da se nivo ekspresije *DsGA20-ox* i *DsGA2-ox* gena nije značajno menjao tokom somatske embriogeneze, dok je nivo ekspresije tri *GA3-ox* gena bio značajno povećan (Mitsubishi *et al.*, 2003). U skladu s tim, tokom ranog razvića SE iz mase proembriogenih globula *Picea abies* DELLA proteini su bili pozitivno regulisani, dok je nivo ekspresije *GA2-ox* bio niži (Vestman *et al.*, 2011). Suprotno tome, analiza transkriptoma u embriogenom tkivu tokom perioda indukcije somatske embriogeneze krompira ukazuje da se tokom ovog perioda ekspimiraju geni specifični za zigotsku embriogenezu (Singla *et al.*, 2007). U skladu s tim u uzvodnoj regulatornoj sekvenci gena *AtGA3-ox2* su detektovana dva RY elementa, specifična za gene za biosintezu rezervnih materija, koji su aktivni tokom sazrevanja embriona (Braybrook *et al.*, 2006). Za RY motiv gena *AtGA3-ox2* se direktno vezuje transkripcioni faktor FUS3 i inhibira njegovu ekspresiju u epidermalnim ćelijama embriona arabidopsisa, što ukazuje da kod nekih biljnih vrsta niži nivo GA stimuliše proces somatske embriogeneze (Curaba *et al.*, 2004). Kod arabidopsisa, ekspresija *AtGA2-ox6* je bila esencijalna za sposobnost *35S:AGL15* da promoviše somatsku embriogenezu (Wang *et al.*, 2004). Transformanti sa povećanom ekspresijom *35S:AtGA2-ox6* su proizveli SE sa većom efikasnošću, dok su *ga2-ox* mutanti imali daleko manji embriogeni potencijal (Wang *et al.*, 2004).

### **5.3.3. Sinergistički efekat svetlosti, auksina i giberelina na promociju embriogenog potencijala**

U ovoj disertaciji je pokazan izuzetan značaj sinergističkog dejstva svetlosti, GA i auksina na indukciju somatske embriogeneze iz odsečaka korenova spanaća. Izostavljanje bilo kog od ovih faktora je izazivalo drastičan pad efikasnosti somatske embriogeneze ili njen potpuni izostanak. Kao što je već istaknuto, auksini i GA interaguju, a svetlost reguliše njihov nivo i na taj način kontroliše fiziološke procese u biljnom organizmu (Halliday *et al.*, 2009). Svetlost kontroliše biosintezu (Tao *et al.*, 2008) i distribuciju auksina (Grieneisen *et al.*, 2007; Laxmi *et al.*, 2008; Titapiwatanakun & Murphy, 2009), kao i

osetljivost individualnih ćelija prema auksinu (Salisbury *et al.*, 2007). Svetlost takođe direktno kontroliše biosintezu GA (Wu *et al.*, 1996; Lee & Zeevaart, 2002; Paparelli *et al.*, 2013). Osim toga, ekspresija *GA20-ox*, GA receptora i DELLA proteina je pod kontrolom cirkadijalnog oscilatora (Hisamatsu *et al.*, 2005; Zentella *et al.*, 2007; Arana *et al.*, 2011), na čije podešavanje svetlost značajno utiče. Međutim, kod arabidopsisa je izvesno da nisu svi geni *GA20-ox* pod kontrolom cirkadijalnog oscilatora (Hisamatsu *et al.*, 2005). Nije poznato da li je jedini klonirani gen spanaća *SoGA20-ox1* pod kontrolom cirkadijalnog oscilatora. Auksini i GA međusobno interaguju. Auksini indukuju biosintezu GA stimulacijom ekspresije *GA3-ox* i represijom ekspresije *GA2-ox* (Ross *et al.*, 2000, 2003; Wolbang & Ross, 2001; Wolbang *et al.*, 2004), a GA povećavaju nivo auksina stimulacijom njihovog polarnog transporta (Björklund *et al.*, 2007). GA vrše i autoregulaciju biosinteze negativnom povratnom spregom (Yamaguchi, 2008).

Međutim, sama regulacija ekspresije ključnih gena za metabolizam GA je izuzetno kompleksna i odvija se na više hijerarhijskih nivoa; npr. ekspresija *AtGA-20ox1* je regulisana na nivou organa, tkiva i ćelija (Desgagné-Penix & Sponsel, 2008). Ekspresija *AtGA20-ox1* je niska u korenu klijanaca arabidopsisa, a visoka u kotiledonima i listovima; snažna je u kotiledonima do 8. dana razvića klijanca, ali je znatno niža u kotiledonima 10 dana starog klijanca (Desgagné-Penix & Sponsel, 2008). Ekspresija *AtGA20-ox1* je metabolički autoregulisana negativnom povratnom spregom. Regulacija na jednom nivou je moguća samo ako to dozvoljava hijerarhijski viši nivo regulacije; npr. tretman paklobutrazolom stimuliše ekspresiju *AtGA20-ox1* u kotiledonima i listovima arabidopsisa 6 dana starih klijanaca, dok taj efekat izostaje u kotiledonima 10 dana starih klijanaca, što ukazuje da je regulacija nivoa GA određena stupnjem razvića snažnija od metaboličke regulacije (Desgagné-Penix & Sponsel, 2008). Četvrti nivo regulacije vrše auksini, pri čemu je metabolička regulacija snažnija od regulacije auksinima; npr. NAA ne stimuliše ekspresiju *AtGA20-ox1* u korenovima arabidopsisa zbog njegove niske organ-specifične ekspresije (Desgagné-Penix & Sponsel, 2008).

Iz priloženog je očigledno da je interakcija svetlosti, auksina i GA sama po sebi izuzetno kompleksna, a to važi i za njihov uticaj na ekspresiju embriogenog potencijala. U ovom radu prisustvo auksina u medijumu za indukciju regeneracije je bilo esencijalno, jer

je u njegovom odsustvu proliferacija tkiva i regeneracija SE bila potpuno inhibirana (nije pokazano u Rezultatima). Zbog toga je u ovoj studiji auksin bio konstantno prisutan u koncentraciji koja je ranije preporučena (Knoll *et al.*, 1997). Međutim, sam auksin nije bio dovoljan da indukuje somatsku embriogenezu, kako u istraživanjima u okviru ove teze, tako i u istraživanjima drugih autora (Komai *et al.*, 1996b; Ishizaki *et al.*, 2001).

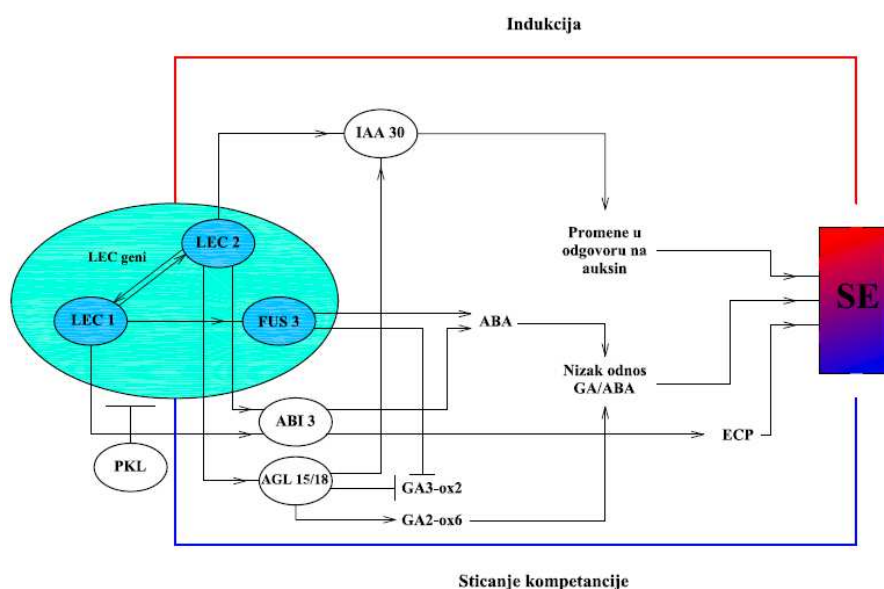
Auksin indukuje ekspresiju gena *LEC1* (Ledwon & Gaj, 2011), *WUS* (Zuo *et al.*, 2002; Gallois *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2009), *FUS3* (Gazzarrini *et al.*, 2004), *AGL15* (Zhu & Perry, 2005) i *SERK1* (Nolan *et al.*, 2003), koji imaju značajnu ulogu u somatskoj embriogenezi, jer njihova ektopična ekspresija indukuje somatsku embriogenezu i pod neinduktivnim uslovima (Gaj *et al.*, 2005).

Nije poznato koji je događaj prvi u indukciji somatske embriogeneze (Zheng *et al.*, 2009). Poznato je da se *LEC* geni (*LEC1*, *LEC2*, *FUS3*), koji imaju redundantne uloge tokom sazrevanja embriona, ekspimiraju na vrlo ranom stupnju embriogeneze redosledom *LEC1*, *LEC2*, *FUS3* (Yamamoto *et al.*, 2014). Pošto su transkripcioni faktori, ovi geni dalje aktiviraju niz drugih gena. *LEC2* direktno indukuje ekspresiju *AGL15* (Braybrook *et al.*, 2006), čija ektopična ekspresija promoviše razviće SE i stimuliše formiranje sekundarnog embrionalnog tkiva na zigotskim embrionima (Heck *et al.*, 1995; Thakare *et al.*, 2008). *AGL15* dalje stimuliše ekspresiju "*INDOLEACETIC ACID-INDUCED PROTEIN30*" (*IAA30*) (Zheng *et al.*, 2009), koji utiče na osetljivost biljnih ćelija prema auksinu (Liscum & Reed, 2002). Predloženo je da ovaj korak predstavlja tačku u kojoj počinje sticanje kompetencije ćelije za somatsku embriogenezu (Sl. 29) (Braybrook *et al.*, 2006).

Međutim, iako izuzetno važni, auksini nisu uvek dovoljni za indukciju somatske embriogeneze; npr. povećana ekspresija *YUCCA* gena nije dovoljna za indukciju somatske embriogeneze (Braybrook & Harada, 2008). Zato se smatra da drugi faktori određuju kompetenciju tkiva da odgovori na auksin, koji zatim pokreće somatsku embriogenezu (Zheng *et al.*, 2009). GA bi mogao imati ovu funkciju pokretanjem remodelovanja hromatina (Ogas *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2014), koje prethodi ekspresiji transkripcionih faktora i indukciji somatske embriogeneze (Sl. 29) (Ogas *et al.*, 1999; Shibukawa *et al.*, 2009; Uddenberg *et al.*, 2011). Rezultati dobijeni u okviru ove teze



podržavaju stav o značaju GA, jer je prisustvo GA<sub>3</sub> u medijumu imalo odlučujući uticaj na ekspresiju embriogenog potencijala eksplantata.



**Slika 29** – Interakcija između LEC, ABI3 i AGL15/18 transkripcionih faktora i njihovi efekti na indukciju somatske embriogeneze. LEC: LEAFY COTYLEDON, ABI3: ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3, AGL15/18: AGAMOUS LIKE 15/18, PKL: PICKLE, FUS: FUSCA, IAA30: AUXINE RESPONSIVE PROTEIN, ECP: EMBRIOGENIC CELL PROTEIN, ABA: apscisinska kiselina, GA: giberelini, GA3-ox: GA3-oksidaaza, GA2-ox: GA2-oksidaaza, SE: somatski embrioni. Adaptirano prema Rocha & Dornelas (2013).

S druge strane, LEC2, FUS3 i AGL15 direktno reprimiraju ekspresiju *AtGA3-ox2* (Curaba *et al.*, 2004; Gazzarrini *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2009) i indukuju ekspresiju *GA2-ox* (Wang *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2009), smanjujući time nivo bioaktivnih GA (Sl. 29). Niži nivo bioaktivnih GA je u korelaciji sa sticanjem kompetencije za somatsku embriogenezu (Wang *et al.*, 2004). Međutim, mutacija *AtGA2-ox6* nije dovoljna da potpuno suprimira somatsku embriogenezu (Wang *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2009), što ukazuje da i drugi faktori učestvuju u indukciji somatske embriogeneze.

Poslednjih godina je učinjen značajan korak ka razumevanju mehanizma indukcije somatske embriogeneze na molekularnom nivou. Međutim, iako su mnogi detalji rasvetljeni, neki aspekti kontrole indukcije somatske embriogeneze, posebno epigenetički, su još uvek na početku istraživanja (Zheng *et al.*, 2009; Rocha & Dornelas, 2013;

Yamamoto *et al.*, 2014). Još uvek nije jasno šta biljne ćelije čini kompetentnim da formiraju SE (Zheng & Perry, 2014).

Potrebna su dodatna istraživanja, u okviru model-sistema prikazanog u ovoj studiji, da bi se definisala uloga ključnih faktora na indukciju somatske embriogeneze. Pre svega, to je dinamička analiza ekspresije ključnih gena za metabolizam GA i nivo endogenih GA. Treba imati na umu da bi i kloniranje preostalih gena spanaća iz familija *GA20-ox*, *GA3-ox* i *GA2-ox* bilo od izuzetnog značaja, pošto je pokazana ne samo tkivna specifičnost ekspresije pojedinih članova ove familije (Frigerio *et al.*, 2006) i njihova diferencijalna ekspresija tokom razvića (Wang *et al.*, 2004; Desgagné-Penix & Sponsel, 2008; Rieu *et al.*, 2008), već i različit uticaj cirkadijalnog oscilatora (Hisamatsu *et al.*, 2005; Rieu *et al.*, 2008) i kvaliteta svetlosti tj. odnos R:FR zračenja (Hisamatsu *et al.*, 2005) na njihovu ekspresiju. Moguće je da neki od gena spanaća koji još nisu klonirani imaju važnu ulogu kako u metabolizmu GA u korenu, tako i u indukciji somatske embriogeneze.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Regenerativni potencijal apikalnih odsečaka korenova spanaća sorte "Matador" je nizak zato što su jedinke sa visokim regenerativnim potencijalom u populaciji vrlo retke.
2. Potencijal odsečaka korenova spanaća sorte "Matador" za regeneraciju somatskih embriona je genetički determinisan i može se značajno povećati samoukrštanjem tokom 4-5 generacija i selekcijom visokoregenerativnih linija.
3. Korenovi izolovani sa biljaka regenerisanih iz somatskih embriona imaju embriogeni potencijal sličan klijancu iz koga su embrioni indukovani.
4. Svetlost ima važnu ulogu u indukciji somatske embriogeneze iz apikalnih fragmenata korenova spanaća sorte "Matador". Somatska embriogeneza je kod svih testiranih linija bila efikasnija u uslovima dugog dana u odnosu na kratak dan. Neke linije su regenerisale samo u uslovima dugog dana.
5. Linije sa visokim regenerativnim potencijalom mogu regenerisati sa niskom efikasnošću i u odsustvu svetlosti.
6. Gustina fluksa fotona svetlosti u opsegu 50-100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$  je optimalna za indukciju somatske embriogeneze iz apikalnih fragmenata korenova spanaća sorte "Matador".
7. Samo retke linije imaju sposobnost regeneracije u odsustvu egzogenih giberelina.
8. Svetlost, auksini i giberelini deluju sinergistički u promociji somatske embriogeneze iz odsečaka korenova spanaća. U odsustvu bilo kog faktora ili njegovom prisustvu na suboptimalnom ili supraoptimalnom nivou, efikasnost indukcije somatske embriogeneze drastično opada ili je potpuno inhibirana.

9. Pored GA<sub>3</sub>, u indukciji somatske embriogeneze se kao egzogeni giberelin može koristiti i GA<sub>1</sub>, ali sa manjom efikasnošću. Kombinacija regulatora rastenja 20μM NAA + 5μM GA<sub>3</sub> je optimalna za indukciju somatske embriogeneze iz apikalnih odsečaka korenova spanaća.
10. U niskim dozama (0.5-1 mg/l) higromicin indukuje pojavu somatskih embriona i sekundarnih somatskih embriona, verovatno delujući kao faktor stresa.
11. Ekspresija gena *SoRIP2* je oko 300 puta veća u globularnim somatskim embrionima u odnosu na koren pod neinduktivnim uslovima i somatskim embrionima većim od na kotiledonarnom stupnju razvića (>5mm).
12. Nivo ekspresije gena *SoRIP2* je u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji ( $r^2=0.81$ ) sa embriogenim potencijalom testiranih linija, te predstavlja dobar marker za selekciju visokoregenerativnih linija.
13. Ekspresija *SoRIP2* omogućava dobru procenu embriogenog potencijala pre nego što su somatski embrioni vidljivi pomoću stereomikroskopa, 8 nedelja ranije nego konvencionalnom metodom.
14. Ekspresija gena *SoRIP2* je pozitivno korelirala ( $r^2=0.92$ ) sa embriogenim potencijalom testiranih linija koji je varirao u odnosu na fotoperiod. Time je potvrđena upotrebljivost ovog gena u testiranju uticaja sredinskih faktora na indukciju somatske embriogeneze.
13. Izolovani apikalni odsecci korenova spanaća su sposobni za percepciju svetlosti i biosintezu GA posle 4 nedelje induktivnog tretmana.
14. Analizom ekspresije ključnih gena za anabolizam (*SoGA20-ox1* i *SoGA3-ox1*) i katabolizam (*SoGA2-ox1*) GA, u eksplantatima korenova pod induktivnim uslovima je pokazano da je embriogeni potencijal u korelaciji sa supresijom gena za anabolizam GA i indukcijom ekspresije gena za katabolizam GA.

15. Interakcija auksina, svetlosti i egzogenih GA je uzrokovala pokretanje katabolizma GA, a embriogeni potencijal je u korelaciji sa ovim fiziološkim stanjem eksplantata.
  
16. Rezultati ovog rada su dobra osnova za dalje istraživanje molekularnog mehanizma indukcije somatske embriogeneze spanaća, upotrebom kolekcije genotipova i model-sistema koji je razvijen tokom ovih istraživanja.

## 7. LITERATURA

- Abou-Alaiwi WA, Potlakayala SD, Goldman SL, Josekutty PC, Karelia DN, Rudrabhatla SV (2012) *Agrobacterium*-mediated transformation of the medicinal plant *Centaurea montana*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 109: 1–8.
- Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP (2003) Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* 15: 2816–2825.
- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311: 91–94.
- Achard P, Gong F, Cheminant S, Alioua M, Hedden P, Genschik P (2008) The Cold-Inducible CBF1 Factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* 20: 2117–2129.
- Adamczyk BJ, Lehti-Shiu MD, Fernandez DE (2007) The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J* 50: 1007–1019.
- Ait-Ali T, Frances S, Weller JL, Reid JB, Kendrick RE, Kamiya Y (1999) Regulation of gibberellin 20-oxidase and gibberellin 3b-hydroxylase transcript accumulation during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiol* 121: 783–791.
- Alabadí D, Gallego-Bartolomé J, Orlando L, García-Cárcel L, Rubio V, Martínez C, Frigerio M, Iglesias-Pedraz JM, Espinosa A, Deng XW, Blázquez MA (2008) Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent *Arabidopsis* seedling de-etiolation in darkness. *Plant J* 53: 324–335.
- Alabadí D, Blázquez MA (2009) Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. *Plant Mol Biol* 69: 409–417.

- Al-Khayri JM, Huang FH, Morelock TE, Busharar TA, Gbur EE (1991a) Genotype – dependent response of spinach cultivars to *in vitro* callus induction and plant regeneration. *Plant Sci* 78: 121–126.
- Al-Khayri JM, Huang FH, Morelock TE (1991b) Regeneration of spinach from leaf callus. *Hort Sci* 26: 913–914.
- Al-Khayri JM, Huang FH, Morelock TE (1991c) Micropagation of spinach. *Arkansas Farm Research* 40: 7.
- Al-Khayri JM, Huang FH, Morelock TE (1991d) *In vitro* flowering in regenerated shoots of spinach. *Hort Sci* 26: 1422.
- Al-Khayri JM, Huang FH, Morelock TE, Busharar TA (1992a) Stimulation of shoot regeneration in spinach callus by gibberellic acid. *Hort Sci* 27: 1046.
- Al-Khayri JM, Huang FH, Morelock TE, Busharar TA (1992b) *In vitro* plant regeneration of spinach from mature seed-derived callus. *In vitro Cell Dev Biol* 28: 64–66.
- Al-Khayri JM (1997) Micropropagation of *Spinacia oleracea* L. (Spinach). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 39: High tech and micropropagation. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 173–200 .
- Al-Sady B, Ni W, Kircher S, Schafer E, Quail PH (2006) Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* 23: 439–446.
- Amoo SO, Finnie JF, Van Staden J (2009) Effects of temperature, photoperiod and culture vessel size on adventitious shoot production of *in vitro* propagated *Huernia hystrix*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 99: 233–238.
- 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 Cult* 102: 285–295.
- Aoshima Y (2005) Efficient embryogenesis in the callus of tea (*Camellia sinensis*) enhanced by the osmotic stress or antibiotic treatment. *Plant Biotechnol* 22: 277–280.

- Arana MV, Marín-de la Rosa N, Maloof JN, Blázquez MA, Alabadí D (2011) Circadian oscillation of gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 9292–9297.
- Aremu AO, Bairu MW, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J (2012) Topolins: a panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tiss Org Cult* 108: 1–16.
- Arroyo-Herrera A, Ku Gonzalez A, Canche Moo R, Quiroz-Figueroa FR, Loyola-Vargas VM, Rodriguez-Zapata LC, Burgeff D'Hondt C, Suárez-Solís VM, Castaño E (2008) Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 94: 171–180
- 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.
- 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 Cult* 90: 15–23.
- Band LR, Úbeda-Tomás S, Dyson RJ, Middleton AM, Hodgman TC, Owen MR, Jensen OE, Bennett MJ, King JR (2012) Growth-induced hormone dilution can explain the dynamics of plant root cell elongation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 7577–7582.
- Bárány I, Testillano PS, Mitkó J, Risueno MC (2001) The switch of the microspore program in *Capiscum* involves HSP 70 expression and leads of the production of haploid plants. *Int J Dev Biol* 45: 39–40.
- Barreto R, Nieto-Sotelo J, Cassab GI (2010) Influence of plant growth regulators and water stress on ramet induction, rosette engrossment and fructan accumulation in *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Plant Cell Tiss Org Cult* 103: 93–101.
- Baudino S, Hansen S, Brettschneider R, Hecht V, Dresselhaus T, Lorz H, Dumas C, Rogowsky P (2001) Molecular characterization of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta* 213: 1–10.



- Bauer D, Viczián A, Kircher S, Nobis T, Nitschke R, Kunkel T, Panigrahi KC, Adám E, Fejes E, Schäfer E, Nagy F (2004) Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1433–1445.
- Behar N, Kumar P, Chandel G (2011) Effect of explant type, genotype and plant growth regulators on morphogenetic potential of flax (*Linum usitatissimum* L.). *J Cell Plant Sci* 2: 13–18.
- Bell LM, Trigiano RN, Conger BV (1993) Relationship of abscisic acid to somatic embryogenesis in *Dactylis glomerata*. *Environ Exp Bot* 33: 495–499.
- 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.
- Benschop JJ, Jackson MB, Guhl K, Vreeburg RAM, Croker, SJ, Peeters AJM, Voesenek LACJ (2005) Contrasting interactions between ethylene and abscisic acid in *Rumex* species differing in submergence tolerance. *Plant J* 44: 756–768.
- Bertram L, Lercari B (2000) Phytochrome A and phytochrome B control the acquisition of competence for shoot regeneration in tomato hypocotyl. *Plant Cell Rep* 19: 604–609.
- Bhalerao RP, Eklof J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G (2002) Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 29: 325–332.
- Bhalla PL, Singh MB (2006) Molecular control of stem cell maintenance in shoot apical meristem. *Plant Cell Rep* 25: 249–256.
- Bian FH, Qu FN, Zheng CX, You CR, Gong XQ (2007) Recent advances in *Cyclamen persicum* Mill. somatic embryogenesis. *North Hortic* 8: 70–72.
- Biswas MK, Islam R, Hossain M (2007) Somatic embryogenesis in strawberry (*Fragaria* sp.) through callus culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 90: 49–54.

- Björklund AS, Antti H, Uddestrand I, Moritz T, Sundberg B (2007) Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. *Plant J* 52: 499–511.
- Blanc G, Lardet L, Martin A, Jacob JL, Carron MP (2002) Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Havea brasiliensis* (Müll. Arg.). *J Exp Bot* 53: 1453–1462.
- 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 Cult* 97: 49–57.
- 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. In: Rabinowitch HD, Currah L (eds) *Allium* crop science: recent advances. CAB International, Wallingford, UK, pp. 145–157.
- Bohanec B (2009) Doubled haploids via gynogenesis. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM (eds) *Advances in haploid production in higher plants*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 35–46.
- Bolibok H, Rakoczy-Trojanowska M (2006) Genetic mapping of QTLs for tissue-culture response in plants. *Euphytica* 149: 73–83.
- Bolibok H, Gruszczynska 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.
- Boszoradova E, Libantova J, Matusikova I, Poloniova Z, Jopcik M, Berenyi M, Moravcikova J (2011) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of economically important oilseed rape cultivars. *Plant Cell Tissue Org Cult* 107: 317–323.

- Bouchabké-Coussa O, Obellianne M, Linderme D, Montes E, Maia-Grondard A, Vilaine F, Pannetier C (2013) Wuschel overexpression promotes somatic embryogenesis and induces organogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues cultured *in vitro*. *Plant Cell Rep* 32: 675–686.
- Boutilier K, Ovinga R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu CM, van Lammeren AA, Miki BL, Custers JB, van Lookeren Campagne MM (2002) Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14: 1737–1749.
- Burgos L, Albuquerque N (2003) Ethylene inhibitors and low kanamycin concentrations improve adventitious regeneration from apricot leaves. *Plant Cell Rep* 21: 1167–1174.
- Burritt DJ, Leung DWM (2003) Adventitious shoot regeneration from *Begonia* × *erythrophylla* petiole sections is developmentally sensitive to light quality. *Physiol Plant* 118: 289–296.
- Brawley SH, Wetherell DF, Robinson KR (1984) Electrical polarity in embryos of wild carrot precedes cotyledon differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6064–6067.
- Braybrook SA, Stone SL, Park S, Bui AQ, Brandon HL, Fischer R, Goldberg RB, Harada JJ (2006) Genes directly regulated by *LEAFY COTYLEDON2* provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3468–3473.
- Braybrook SA, Harada JJ (2008) LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci* 13: 624–630.
- Bregitzer P, Campbell RD (2001) Genetic markers associated with green and albino plant regeneration from embryogenic barley callus. *Crop Sci* 41: 173–179.
- Britto DT, Kronzucker HJ (2002)  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol* 159: 567–584.
- Ćalić D, Zdravković-Korać S, Jevremović S, Guć-Šćekić M, Radojević Lj (2003/4) Efficient haploid induction in microspore suspension culture of *Aesculus hippocastanum* and karyotype analysis. *Biologia Plant* 47: 289–292.

- Ćalić D, Zdravković-Korać S, Radojević Lj (2005) Secondary embryogenesis in androgenic embryo cultures of *Aesculus hippocastanum* L. *Biol Plantarum* 49: 435–438.
- Carimi F, De Pasquale F, Puglia AM (1998) *In vitro* rescue of zygotic embryos of sour orange, *Citrus aurantium* L., and their detection based on RFLP analysis. *Plant Breed* 117: 261–266.
- Carimi F, De Pasquale F, Crescimanno FG (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of *Citrus*. *Plant Cell Rep* 18: 935–940.
- Chailakhyan MK, Khryanin VN (1979) The role of leaves in sex expression in hemp and spinach. *Planta* 144: 205–207.
- Charrière F, Hahne G (1998) Induction of embryogenesis versus caulogenesis on *in vitro* cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. *Plant Sci* 137: 63–71.
- 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.
- Chen THH, Marowitch J, Thompson BG (1987) Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of alfalfa. *Plant Cell Tiss Org Cult* 8: 73–81.
- Chen YJ, Lai ZX (2001) Researches and utilization of somatic embryogenesis in fruits and trees. *J Fujian Agricult Univ* 30: 420–426.
- Chen M, Schwab R, Chory J (2003) Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 14493–14498.
- Chen JT, Chang WC (2003) Effects of GA, ancymidol, cycocel and paclobutrazol on direct somatic embryogenesis of *Oncidium in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 72: 105–108.
- Chen M, Chory J, Fankhauser C (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* 38: 87–117.

- Chen M, Chory J (2011) Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends Cell Biol* 21: 664–671.
- Chen JR, Wu L, Hu BW, Yi X, Liu R, Deng ZN, Xiong XY (2014) The influence of plant growth regulators and light quality on somatic embryogenesis in China rose (*Rosa chinensis* Jacq.). *J Plant Growth Regul* 33: 295–304.
- 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.
- Chhikara S, Chaudhury D, Dhankher OP, Jaiwal PK (2012) Combined expression of a barley class II chitinase and type I ribosome inactivating protein in transgenic *Brassica juncea* provides protection against *Alternaria brassicae*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 108: 83–89.
- 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.
- Chin DP, Bao JH, Mii M (2009) Transgenic spinach plants produced by *Agrobacterium*-mediated method based on the low temperature-dependent high plant regeneration ability of leaf explants. *Plant Biotechnol* 26: 243–248.
- Christianson ML, Warnick DA (1983) Competance and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Dev Biol* 95: 288–293.
- Chu YF, Sun J, Wu X, Liu RH (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *J Agric Food Chem* 50: 6910–6916.
- Cionini PG, Bennici A, Alpi A, D'Amato F (1976) Suspensor, gibberellin and *in vitro* development of *Phaseolus coccineus* embryos. *Planta* 131: 115–117.
- Claeys H, Skirycz A, Maleux K, Inzé D (2012) DELLA signaling mediates stress-induced cell differentiation in *Arabidopsis* leaves through modulation of anaphase-promoting complex/cyclosome activity. *Plant Physiol* 159: 739–747.

- Claeys H, Inzé D (2013) The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Physiol* 162: 1768–1779.
- Claeys H, De Bodt S, Inzé D (2014) Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks. *Trends Plant Sci* 19: 231–239.
- Coles JP, Phillips AL, Croker SJ, Garcia-Lepe R, Lewis MJ, Hedden P (1999) Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant J* 17: 547–556.
- Compton ME (1999) Dark pretreatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon. *Plant Cell Tiss Org Cult* 58: 185–188.
- Costa MGC, Nogueira FTS, Figueira ML, Otoni WC, Brommonschenkel SH, Cecon PR (2000) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Plant Cell Rep* 19: 327–332.
- Cui KR, Dai RL (2000) Molecular biology of plant somatic embryogenesis. Science Press, Beijing, China, pp. 48–53.
- Ćulafić Lj (1973) Induction of flowering of isolated *Spinacia oleracea* L. Buds in sterile culture. *Bull Inst Jard Bot Univ Beograd* 7: 1–4.
- Ćulafić Lj, Budimir S, Vujičić R, Nešković M (1987) Induction of somatic embryogenesis and embryo development in *Rumex acetosella* L. *Plant Cell Tissue Org Cult* 11: 133–139.
- Ćulafić Lj, Nešković M (1980) Effect of growth substances on flowering and sex expression in isolated apical buds of *Spinacia oleracea*. *Physiol Plant* 48: 588–591.
- Curaba J, Moritz T, Blervaque R, Parcy F, Raz V, Herzog M, Vachon G (2004) *AtGA3ox2*, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 136: 3660–3669.
- Dai C, Xue HW (2010) Rice EARLY FLOWERING1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *EMBO J* 29: 1916–1927.
- Das T, Mitra GC, Chatterjee A (1995) Micropropagation of *Citrus sinensis* var. Mosambi: an important scion. *Phytomorph* 45: 57–64.

- Da Silva Mendes AF, Cidade LC, De Oliveira MLP, Otoni WC, Soares-Filho WDS, Costa MGC (2009) Evaluation of novel betalactam antibiotics in comparison to cefotaxime on plant regeneration of *Citrus sinensis* L Osb. *Plant Cell Tissue Org Cult* 97: 331–336.
- Debergh PC, Maene LJ (1981) A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci Hortic* 14: 335–345.
- De Lucas M, Davière JM, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blázquez MA, Titarenko E, Prat S (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451: 480–486.
- Deng CL, Qin RY, Cao Y, Gao J, Li SF, Gao WJ, Lu LD (2013) Microdissection and painting of the Y chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*). *J Plant Res* 126: 549–556.
- Depuydt S, Hardtke CS (2011) Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr Biol* 21: R365–R373.
- Desgagné-Penix I, Sponsel VM (2008) Expression of gibberellin 20-oxidase1 (*AtGA20ox1*) in *Arabidopsis* seedlings with altered auxin status is regulated at multiple levels. *J Exp Bot* 59: 2057–2070.
- Desjardins Y, Dubuc JF, Badr A (2009): *In vitro* culture of plants: a stressful activity! *Acta Horticult* 812: 29–50.
- D’Onofrio C, Morini S, Bellocchi G (1998) Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves. *Plant Cell Tiss Org Cult* 53: 91–98.
- De Virgilio M, Lombardi A, Caliandro R, Fabbrini MS (2010) Ribosome-inactivating proteins: from plant defense to tumor attack. *Toxins* 2: 2699–2737.
- De Vries SC, Booij H, Meyerink P, Huisman G, Wilde HD, Thomas TL, van Kammen A (1988) Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta* 176: 196–204.
- Dhonukshe P, Mathur J, Hulskamp M, Gadella TW (2005) Microtubule plus-ends reveal essential links between intracellular polarization and localized modulation of endocytosis during division-plane establishment in plant cells. *BMC Biology* 3: 11.

- Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Sun TP (2004) The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* 16: 1392–1405.
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J Exp Bot* 48: 1493–1509.
- Duan L, Dietrich D, Ng CH, Yeen Chan PM, Bhalerao R, Bennett MJ, Dinneny JR (2013) Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 25: 324–341.
- Duclercq J, Sangwan-Norreel B, Catterou M, Sangwan RS (2011) *De novo* shoot organogenesis: from art to science. *Trends Plant Sci* 16: 597–606.
- 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.
- Dugardeyn J, Vandenbussche F, Van der Straeten, D (2008) To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross talk by *in silico* gene expression analysis? *J Exp Bot* 59: 1–16.
- Dunwell JM (2010) Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol J* 8: 377–424.
- 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 regenerations. *Biol Plant* 47: 179–183.
- Eady CC, Lister CE (1998) A comparison of four selective agents for use with *Allium cepa* L. immature embryos and immature embryo-derived cultures. *Plant Cell Rep* 18: 117–121.
- Eapen S, George L (1990) Influence of phytohormones, carbohydrates, aminoacids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger millet. *Plant Cell Tiss Org Cult* 22: 87–93.
- 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.



- Eriksson ME, Moritz T (2002) Daylength and spatial expression of a gibberellin 20-oxidase isolated from hybrid aspen (*Populustremula* L. x *P.tremuloides* Michx.). *Planta* 214: 920–930.
- Fabian T, Lorbiecke R, Umeda M, Sauter M (2000) The cell cycle genes *cycA1;1* and *cdc2Os-3* are coordinately regulated by gibberellin in planta. *Planta* 211: 376–383.
- Fan C, Pu N, Wang X, Wang Y, Fang L, Xu W, Zhang J (2008) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) with a novel stilbene synthase gene from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 92: 197–206.
- Fehér A, Pasternak T, Dudits (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74: 201–228.
- Fehér A (2008) The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biol Szegediensis* 52: 53–56.
- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz JM, Kircher S, Schäfer E, Fu X, Fan LM, Deng XW (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451: 475–480.
- Feng JC, Yu XM, Shang XL, Li JD, Wu YX (2010) Factors influencing efficiency of shoot regeneration in *Ziziphus jujuba* Mill. 'Huizao'. *Plant Cell Tiss Org Cult* 101: 111–117.
- Filardo F, Robertson M, Singh DP, Parish RW, Swain SM (2009) Functional analysis of HvSPY, a negative regulator of GA response, in barley aleurone cells and *Arabidopsis*. *Planta* 229: 523–537.
- Francis D, Sorrell DA (2001) The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *Plant Growth Regul* 33: 1–12.
- Franz PF, Schel JHN (1991) Cytodifferentiation during the development of friable embryogenic callus of maize (*Zea mays*). *Can J Bot* 69: 26–33.
- Frigerio M, Alabadi D, Perez-Gomez J, Garcia-Carcel L, Phillips AL, Hedden P, Blazquez MA (2006) Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 142: 553–563.

- 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.
- Fu X, Richards DE, Ait-ali T, Hynes LW, Ougham H, Peng J, Harberd NP (2002) Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. *Plant Cell* 14: 3191–3200.
- Fu X, Harberd NP (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421: 740–743.
- Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul* 43: 27–47.
- 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.
- Gallego-Bartolomé J, Minguet EG, Marín JA, Prat S, Blázquez MA, Alabadí D (2010) Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol* 27: 1247–1256.
- Gallego-Bartolomé J, Alabadí D, Blázquez MA (2011) DELLA-induced early transcriptional changes during etiolated development in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 6: e23918.
- Gallego-Bartolomé J, Minguet EG, Grau-Enguix F, Abbas M, Locascio A, Thomas SG, Alabadí D, Blázquez MA (2012) Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 13446–13451.
- Galen C, Rabenold JJ, Liscum E (2007) Light-sensing in roots. *Plant Signal Behav* 2: 106–108.
- Galinha C, Bilsborough G, Tsiantis M (2009) Hormonal input in plant meristems: a balancing act. *Semin Cell Dev Biol* 20: 1149–1156.
- Gallois JL, Woodward C, Reddy GV, Sablowski R (2002) Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development* 129: 3207–3217.

- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151–158.
- Garzon CD, Flores FJ (2013) Hormesis: biphasic dose-responses to fungicides in plant pathogens and their potential threat to agriculture. In: Nita M (ed) *Fungicides - showcases of integrated plant disease management from around the world*. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 311–328.
- Gašić K, Hernandez A, Korban S (2004) RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol Biol Rep* 22: 437a–437g.
- Gazzarrini S, Tsuchiya Y, Lumba S, Okamoto M, McCourt P (2004) The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Dev Cell* 4: 373–385.
- Geekiyanage S, Takase T, Watanabe S, Fukai S, Kiyouse T (2006) The combined effect of photoperiod, light intensity and GA<sub>3</sub> on adventitious shoot regeneration from cotyledons of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Biotechnol* 23: 431–435.
- George EF, Debergh PC (2008) Micropropagation: uses and methods. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) *Plant propagation by tissue culture, Vol. 1: The Background*, 3<sup>rd</sup> edn. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 29–64.
- Gerdakaneh M, Mozafari AA, Sioseh-Mardah A, Sarabi B (2011) Effects of different amino acids on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Acta Physiol Plant* 33: 1847–1852.
- Gilmour SJ, Zeevaart JAD, Schwenen L, Graebe JE (1986) Gibberellin metabolism in cell – free extracts from spinach leaves in relation to photoperiod. *Plant Physiol* 82: 190–195.
- Glowacha K, Jezowski S, Kaczmarek Z (2010) The effects of genotype, inflorescence developmental stage and induction medium on callus induction and plant regeneration in two *Miscanthus* species. *Plant Cell Tiss Org Cult* 102: 79–86.
- Gonzalez N, De Bodt S, Sulpice R, Jikumaru Y, Chae E, Dhondt S, Van Daele T, De Milde L, Weigel D, Kamiya Y, Stitt M, Beemster GTS, Inzé D (2010) Increased leaf size: different means to an end. *Plant Physiol* 153: 1261–1279.

- 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.
- Goto T, Miyazaki M, Oku M (1996) An improved procedure for protoplast culture and plant regeneration of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *J Japan Soc Hort Sci* 65: 349–354.
- Gou J, Strauss SH, Tsai CJ, Fang K, Chen Y, Jiang X, Busov VB (2010) Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *Plant Cell* 22: 623–639.
- Graebe JE (1987) Gibberellin biosynthesis and control. *Ann Rev Plant Physiol* 38: 419–465.
- 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.
- Grieneisen VA, Xu J, Maree AF, Hogeweg P, Scheres B (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 449: 1008–1013.
- Grimes HD, Hodges TK (1990) The inorganic  $\text{NO}_3^-$ :  $\text{NH}_4^+$  ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Physiol* 136: 362–367.
- Grubb CD, Abel S (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Sci* 11: 89–100.
- Guha S, Maheshwari SC (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497.
- Guo F, Liu C, Xia H, Bi Y, Zhao C, Zhao S, Hou L, Li F, Wang X (2013) Induced expression of *AtLEC1* and *AtLEC2* differentially promotes somatic embryogenesis in transgenic tobacco plants. *PLoS ONE* 8: e71714.

- Gutiérrez Pesce P, Rugini E (2004) Influence of plant growth regulators, carbon sources and iron on the cyclic secondary somatic embryogenesis and plant regeneration of transgenic cherry rootstock "Colt" (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 79: 223–232.
- Haberlandt G (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber Math – Naturwiss Kl Kais Akad Wiss* 111: 454–461.
- Halliday KJ, Fankhauser C (2003) Phytochrome-hormonal signalling networks. *New Phytol* 157: 449–463.
- Halliday KJ, Martínez-García JF, Josse EM (2009) Integration of light and auxin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a001586. doi: 10.1101/cshperspect.a001586.
- Hanson J, Smeekens S (2009) Sugar perception and signaling - an update. *Curr Opin Plant Biol* 12: 562–567.
- Hartley MR, Chaddock JA, Bonness MS (1996) The structure and function of RIP. *Trends Plant Sci* 1: 254–260.
- Hauvermale AL, Ariizumi T, Steber CM (2012) Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression. *Plant Physiol* 160: 83–92.
- Hays DB, Yeung EC, Pharis RP (2002) The role of gibberellins in embryo axis development. *J Exp Bot* 53: 1747–1751.
- He X, Chen T, Zhu J (2011) Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res* 21: 442–465.
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U, De Vries SC (2001) The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* 127: 803–816.
- Heck GR, Perry SE, Nichols KW, Fernandez DE (1995) AGL15, a MADS-domain protein expressed in developing embryos. *Plant Cell* 7: 1271–1282.
- Hedden P (1990) Gibberellin biosynthesis enzymes and the regulation of gibberellin concentration. In: Takahashi N, Phinney BO, MacMillan J (eds) *Gibberellins*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 94–105.

- Hedden P, Kamiya Y (1997) Gibberelin biosynthesis: Enzymes, genes and their regulation. *Annu Rev Plant Mol Biol* 48: 431–460.
- Hedden P, Phillips AL (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* 5: 523–530.
- Hedden P, Thomas SG (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J* 444: 11–25.
- Heinrich M, Hettenhausen C, Lange T, Wünsche H, Fang JJ, Baldwin, IT, Wu J (2013) High levels of jasmonic acid antagonize the biosynthesis of gibberellins and inhibit the growth of *Nicotiana attenuata* stems. *Plant J* 73: 591–606.
- Hiltbrunner A, Viczián A, Bury E, Tscheuschler A, Kircher S, Tóth R, Honsberger A, Nagy F, Fankhauser C, Schäfer E (2005) Nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor requires FHY1. *Curr Biol* 15: 2125–2130.
- Hisamatsu T, King RW, Helliwell CA, Koshioka M (2005) The involvement of gibberellin 20-oxidase genes in phytochrome regulated petiole elongation of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138: 1106–1116.
- Hita O, Gallego P, Villalobos N, Lanas I, Blazquez A, Martin JP, Fernandez J, Martin L, Guerra H (2003) Improvement of somatic embryogenesis in *Medicago arborea*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 72: 13–18.
- Hoecker U, Toledo-Ortiz G, Bender J, Quail PH (2004) The photomorphogenesis-related mutant red1 is defective in CYP83B1, a red light-induced gene encoding a cytochrome P450 required for normal auxin homeostasis. *Planta* 219: 195–200.
- Hou X, Hu WW, Shen L, Lee LY, Tao Z, Han JH, Yu H (2008) Global identification of DELLA target genes during *Arabidopsis* flower development. *Plant Physiol* 147: 1126–1142.
- 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 Cult* 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.
- Huang WL, Tsung YC, Liu LF (2002) Osmotic stress promotes shoot regeneration in immature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). *J Agric Assoc China* 3: 76–86.
- Huang WL, Lee CH, Chen YR (2012) Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress. *Plant Cell Tiss Org Cult* 108: 257–263.
- Humara JM, Ordas RJ (1999) The toxicity of antibiotics and herbicides on *in vitro* adventitious shoot formation on *Pinus pinea* L. cotyledons. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 35: 339–343.
- Hunault G, Maatar A (1995) Enhancement of somatic embryogenesis frequency by gibberellic acid in fennel. *Plant Cell Tiss Org Cult* 41: 171–176.
- Hunter DC, Burritt DJ (2004) Light quality influences adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 215–220.
- Huq E, Quail PH (2002) PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* 21: 2441–2450.
- Huq E, Al-Sady B, Quail PH (2003) Nuclear translocation of the photoreceptor phytochrome B is necessary for its biological function in seedling photomorphogenesis. *Plant J* 35: 660–664.
- Iglesias R, Perez Y, de Torre C, Ferreras JM, Antolin P, Jimenez P, Rojo MA, Mendez E, Girbes T (2005) Molecular characterization and systemic induction of single-chain ribosome-inactivating proteins (RIPs) in sugar beet (*Beta vulgaris*) leaves. *J Exp Bot* 56: 1675–1684.
- Ikeda-Iwai M, Umehara M, Satoh S, Kamada H (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 34: 107–114.

- Iraqi D, Tremblay FM (2001a) The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) BSP) and white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos. *Physiol Plant* 111: 381–388.
- Iraqi D, Tremblay FM (2001b) Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *J Exp Bot* 52: 2301–2311.
- Irvin JD (1983) Pokeweed antiviral protein. *Pharmacol Ther* 21: 371–387.
- Irvin JD, Uckun FM (1992) Pokeweed antiviral protein: ribosome inactivation and therapeutic applications. *Pharmacol Ther* 55: 279–302.
- 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 Cult* 67: 251–255.
- Ishizaki T, Megumi C, Komai F, Masuda K, Oosawa K (2002) Accumulation of a 31-kDa glycoprotein in association with the expression of embryogenic potential by spinach callus culture. *Physiol Plantarum* 114: 109–115.
- Israelsson M, Mellerowcz E, Chon M, Gullberg J, Moritz T (2004) Cloning and overproduction of gibberellin 3-oxidase in hybrid aspen trees. Effect on gibberellin homeostasis and development. *Plant Physiol* 135: 221–230.
- Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sato Y, Ashikari M, Matsuoka M (2002) The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell* 14: 57–70.
- Jackson SD, James PE, Carrera E, Prat S, Thomas B (2000) Regulation of transcript levels of a potato gibberellin 20-oxidase gene by light and phytochrome B. *Plant Physiol* 124: 423–430.
- Jang IC, Henriques R, Seo HS, Nagatani A, Chua NH (2010) *Arabidopsis* PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR proteins promote phytochrome B polyubiquitination by COP1 E3 ligase in the nucleus. *Plant Cell* 22: 2370–2383.



- Jang IC, Chung PJ, Hemmes H, Jung C, Chua NH (2011) Rapid and reversible light-mediated chromatin modifications of *Arabidopsis* phytochrome A locus. *Plant Cell* 23: 459–470.
- Janick J, Stevenson EC (1955) Genetics of monoecious character in spinach. *Genetics* 40: 429–437.
- Javed MA, Ishi T, Kamijima O, Misoo S (2007) The role of alternating culture temperatures and maltose in enhancing anther culture efficiency of salt tolerant indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars, Pokkali and Nona Bokra. *Plant Biotechnol* 24: 283–287.
- 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.
- Ji A, Geng X, Zhang Y, Yang H, Wu H (2011) Advances in somatic embryogenesis research of horticultural plants. *American J Plant Sci* 2: 727–732.
- 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 Cult* 97: 159–165.
- Jiang X, Li H, Wang T, Peng C, Wang H, Wu H, Wang X (2012) Gibberellin indirectly promotes chloroplast biogenesis as a means to maintain the chloroplast population of expanded cells. *Plant J* 72: 768–780.
- Jiao Y, Lau OS, Deng XW (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* 8: 217–230.
- Jimenez VM (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Rev Bras de Fisio Veg* 13: 196–223.
- Jiménez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul* 47: 91–110.
- 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.

- Jing Y, Zhang D, Wang X, Tang W, Wang W, Huai J, Xu G, Chen D, Li Y, Lina R (2013) *Arabidopsis* chromatin remodeling factor PICKLE interacts with transcription factor HY5 to regulate hypocotyl cell elongation. *Plant Cell* 25: 242–256.
- Kamada H, Harada H (1979) Studies on organogenesis in carrot tissue culture. I. Effects of growth regulation on somatic embryogenesis and root formation. *Z Pflanzenphysiol* 91: 225-266.
- Kamada H, Kobayashi K, Kiyosue T, Harada H (1989) Stress-induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro Cell Dev Biol* 25: 1163-1166.
- Kamada H, Ishikawa K, Saga H, Harada H (1993) Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tiss Cult Lett* 10: 38-44.
- Kamada H, Tachikawa Y, Saitou T, Harada H (1994) Heat stress induction of carrot somatic embryogenesis. *Plant Tiss Cult Lett* 11: 229-232.
- Kanwar K, Joseph J, Deepika R (2010) Comparison of *in vitro* regeneration pathways in *Punica granatum* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 100: 199–207.
- Karami O, Aghavaisi B, Pour AM (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *J Chem Biol* 2: 177–190.
- Kawade K, Ishizaki T, Masuda K (2008) Differential expression of ribosome-inactivating protein genes during somatic embryogenesis in spinach (*Spinacia oleracea*). *Physiol Plantarum* 134: 270–281.
- Kawade K, Masuda K (2009) Transcriptional control of two ribosome – inactivating protein genes expressed in spinach (*Spinacia oleracea*) embryos. *Plant Physiol Biochem* 47: 327–334.
- Kikuchi A, Sanuki N, Higashi K, Koshihara T, Kamada H (2006) Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta* 223: 637-645.
- Kikuchi A, Asahina M, Tanaka M, Satoh S, Kamada H (2013) Acquisition of embryogenic competency does not require cell division in carrot somatic cell. *J Plant Res* 126: 243–250.

- Kim YW, Moon HK (2007) Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 88: 241–245.
- Kircher S, Gil P, Kozma-Bognár L, Fejes E, Speth V, Husselstein-Muller T, Bauer D, Adám E, Schäfer E, Nagy F (2002) Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* 14: 1541–1555.
- Knoll KA, Short KC, Curtis IS, Power JB, Davey JB (1997) Shoot regeneration from cultured root explants of spinach (*Spinacia oleracea* L.): a system for *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep* 17: 96–101.
- Koetle MJ, Finnie JF, Van Staden J (2010) *In vitro* regeneration in *Dierama erectum* Hilliard. *Plant Cell Tiss Org Cult* 103: 23–31.
- 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 Cult* 55: 141–145.
- Koltunow AM, Grossniklaus U (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Ann Rev Plant Biol Plant Mol Biol* 54: 547–574.
- Komai F, Okuse I, Harada T (1995) Histological identification of somatic embryogenesis from excised root tissues of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Tiss Cult Lett* 12: 313–315.
- Komai F, Okwe I, Harada T (1996a) Somatic embryogenesis and plant regeneration in culture of root segments of spinach (*Spinacia oleracea* L.) *Plant Sci* 113: 203–208.
- Komai F, Okuse I, Harada T (1996b) Effective combinations of plant growth regulators for somatic embryogenesis from spinach root segments. *J Japan Soc Hort Sci* 65: 559–564.
- Komai F, Masuda K, Ishizaki T, Harada T (1999) Sex expression in plants regenerated from the root callus of female and male spinach (*Spinacia oleracea*). *Plant Sci* 146: 35–40.
- Komai F, Shikazono N, Tanaka A (2003) Sexual modification of female spinach seeds (*Spinacia oleracea* L.) by irradiation with ion particles. *Plant Cell Rep* 21: 713–717.

- Komai F, Masuda K (2004) Plasticity in sex expression of spinach (*Spinacia oleracea*) regenerated from root tissues. *Plant Cell Tiss Org Cult* 78: 285–287.
- Komamine A, Kawahara R, Matsumoto M, Sunabori S, Toya T, Fujiwara A, Tsukahara M, Smith J, Ito M, Fukuda H, Nomura K, Fujimura T (1992) Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures—physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 28: 11–14.
- Kondo K, Nadamitsu S, Tanaka R, Taniguchi K (1991) Micropropagation of *Spinacia oleracea* L. through culture of shoot primordial. *Plant Tiss Cult Lett* 8: 1–4.
- Kononowicz H, Janick J (1984) Response of embryogenic callus of *Theobroma cacao* L. to gibberellic acid and inhibitors of gibberellic acid synthesis. *Z Pflanzenphysiol* 113: 359–366.
- Kumari RBD, Kumar SP (2011) Ribosome inactivating proteins: an overview. *J Pharm Res* 4: 769–772.
- Kurczyńska EU, Gaj MD, Ujczak A, Mazur E (2007) Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 226: 619–628.
- Kwaaitaal M, de Vries SC, Russinova E (2005) *Arabidopsis thaliana* Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 protein is present in sporophytic and gametophytic cells and undergoes endocytosis. *Protoplasma* 226: 55–65.
- Kwaaitaal MACJ, de Vries SC (2007) The SERK1 gene is expressed in procambium and immature vascular cells. *J Exp Bot* 58: 2887–2896.
- Kwon HK, Wang MH (2011) The D-type cyclin gene (*Nicta*;-CycD3;4) controls cell cycle progression in response to sugar availability in tobacco. *J Plant Physiol* 168: 133–139.
- Lange T (1998) Molecular biology of gibberellin synthesis. *Planta* 204: 409–419.
- Langhansova L, Konradova H, Vanek T (2004) Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos. *Plant Cell Rep* 22: 725–730.
- Lau OS, Deng XW (2010) Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Curr Opin Plant Biol* 13: 571–577.

- Laxmi A, Pan J, Morsy M, Chen R (2008) Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. PLoS One 3: e1510.
- Ledwon A, Gaj MD (2011) *LEAFY COTYLEDON1*, *FUSCA3* expression and auxin treatment in relation to somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. Plant Growth Regul 65: 157–167.
- Lee DJ, Zeevaart JAD (2002) Differential regulation of RNA levels of gibberellin dioxygenases by photoperiod in spinach. Plant Physiol 130: 2085–2094.
- Lee DJ, Zeevaart JAD (2005) Molecular cloning of GA 2-oxidase3 from spinach and its ectopic expression in *Nicotiana glauca*. Plant Physiol 138: 243–254.
- Lee DJ, Zeevaart JAD (2007) Regulation of gibberellin 20-oxidase1 expression in spinach by photoperiod. Planta 226: 35–44.
- 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 Cult 90: 141–151.
- Lee LYC, Hou X, Fang L, Fan S, Kumar PP, Yu H (2012) STUNTED mediates the control of cell proliferation by GA in *Arabidopsis*. Development 139: 1568–1576.
- Lee ST, Huang WL (2013) Cytokinin, auxin, and abscisic acid affects sucrose metabolism conduce to *de novo* shoot organogenesis in rice (*Oryza sativa* L.) callus. Bot Studies 54: 5.
- Legrand S, Hendriks T, Hilbert JL, Quillet MC (2007) Characterisation of expressed sequence tags obtained by SSH during somatic embryogenesis in *Cichorium intybus* L. BMC Plant Biol 7:27.
- Leguillon S, Charles G, Branchard M (2003) Plant regeneration from thin cell layers in *Spinacia oleracea*. Plant Cell Tiss Org Cult 74: 257–265.
- Leljak-Levanić D, Bauer N, Mihaljević S, Jelaska S (2004a) Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): control of somatic embryo development by nitrogen compounds. J Plant Physiol 161: 229–236.

- Lejtek-Levanić D, Bauer N, Mihaljević S, Jelaska S (2004b) Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Rep* 23: 120–127.
- Lercari B, Moscatelli S, Ghirardi E, Niceforo R, Bertram L (1999) Photomorphogenic control of shoot regeneration from etiolated and light-grown hypocotyls of tomato. *Plant Sci* 140: 53–61.
- Li J (2010) Multi-tasking of somatic embryogenesis receptor-like protein kinases. *Curr Opin Plant Biol* 13: 509–514.
- 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 Cult* 112: 275–287.
- Li H, Soriano M, Cordewener J, Muiño JM, Riksen T, Fukuoka H, Angenent GC, Boutilier K (2014) The histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes totipotency in the male gametophyte. *Plant Cell* 26: 195–209.
- Lipavská H, Konrádová H (2004) Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 23–30.
- Liscum E, Reed J W (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* 49: 387–400.
- 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 RS, Yang JH, Liu WY (2002) Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome-inactivating protein from cryptogamic algal plant (*Laminaria japonica* A). *Eur J Bio Chem* 269: 4746–4752.
- Liu B, Zuo Z, Liu H, Liu X, Lin C (2011) *Arabidopsis* cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes Dev* 25: 1029–1034.
- 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 Cult* 108: 529–534.
- Livak KJ, Schmittgen, TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $\Delta\Delta C_t$  method. *Methods* 25: 402–408.

- Lord JM (1985) Precursors of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. Glycosylation and processing during synthesis and intracellular transport. *Eur J Biochem* 146: 411–16.
- LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Orselli S, Terzi M (1989) DNA methylation of embryonic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones, and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet* 77: 325–331.
- Lotan T, Ohto MA, Yee KM, West MA, 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.
- Luo YC, Zhou H, Li Y, Chen JY, Yang JH, Chen YQ, Qu LH (2006) Rice embryogenic calli express a unique set of microRNAs, suggesting regulatory roles of microRNAs in plant postembryonic development. *FEBS Lett* 580: 5111–5116.
- Mac Millan J (2001) Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria. *J Plant Growth Regul* 20: 387–442.
- Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Oda K (2008) The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, *GA2ox7*, under high-salinity stress in *Arabidopsis*. *Plant J* 56: 613–626.
- Mahdavi-Darvari F, Noor NM, Ismanizan I (2015) Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 120: 407–422.
- 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.
- Maraschin SF, Priester W, Spaink HP, Wang M (2005) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from male gametophyte perspective. *J Exp Bot* 56: 1711–1726.
- Marchionni Basté E, Pratta GR, Zorzoli R (2007) Genetic analysis of the *in vitro* culture response in tomato. *Plant Cell Tiss Org Cult* 88: 233–239.

- Marín-de la Rosa N, Sotillo B, Miskolczi P, Gibbs DJ, Vicente J, Carbonero P, Oñate-Sánchez L, Holdsworth MJ, Bhalerao R, Alabadí D, Blázquez MA (2014) Large-scale identification of gibberellin-related transcription factors defines group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as functional DELLA partners. *Plant Physiol* 166: 1022–1032.
- Meinke DW (1992) A homoeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science* 258: 1647–1650.
- Meinke DW, Franzmann LH, Nickle TC, Yeung EC (1994) Leafy cotyledon mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 1049–1064.
- Meng ZH, Liang AH, Yang WC (2007) Effects of hygromycin on cotton cultures and its application in *Agrobacterium*-mediated cotton transformation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 43: 111–118.
- 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 Cult* 106: 1–10.
- Merkle SA, Montello PM, Xia X, Upchurch BL, Smith DR (2005) Light quality treatments enhance somatic seedling production in three southern pine species. *Tree Physiol* 26: 187–194.
- Metzger JD, Zeevaart JAD (1980) Effect of photoperiod on the levels of endogenous gibberellins in spinach as measured by combined gas chromatography-selected ion current monitoring. *Plant Physiol* 66: 844–846.
- Metzger JD, Zeevaart JAD (1982) Photoperiodic control of gibberellin metabolism in spinach. *Plant Physiol* 69: 287–291.
- Michler CH, Lineberger RD (1987) Effects of light on somatic embryo development and abscisic levels in carrot suspension cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 11: 189–207.
- Miguel C, Marum L (2011) An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *J Exp Bot* 62: 3713–3725.
- Mihaljević S, Radić S, Bauer N, Garić R, Mihaljević B, Horvat G, Leljok-Levanić D, Jelaska S (2011) Ammonium-related metabolic changes affect somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). *J Plant Physiol* 168: 1943–1951.



- Mii M, Okuda K, Iizuka M (1987) Plant regeneration from hypocotyl segments of *Spinacia oleracea*. Jpn J Breed 37: 24–25.
- Mii M, Nakano M, Okuda K, Iizuka M (1992) Shoot regeneration from spinach hypocotyl segments by short term treatment with 5.6-dichloro-indole-3-acetic acid. Plant Cell Rep. 11: 58–61.
- 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 Cult 73: 21–35.
- Mitsuhashi W, Toyomasu T, Masui H, Katho T, Nakaminami K, Kashiwagi Y, Akutsu M, Kenmoku H, Sassa T, Yamaguchi S, Kamiya Y, Kamada H (2003) Gibberellin is essentially required for carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis: dynamic regulation of gibberellin 3-oxidase gene expressions. Biosci Biotechnol Biochem 67: 2438–2447.
- Molas ML, Kiss JZ (2008) PKS1 plays a role in red-light-based positive phototropism in roots. Plant Cell Environ 31: 842–849.
- Mølmann JA, Asante DKA, Jensen JB, Krane MN, Ernstsén A, Junttila O, Olsen JE (2005) Low night temperature and inhibition of gibberellin biosynthesis override phytochrome action and induce bud set and cold acclimation, but not dormancy in PHYA overexpressors and wild-type of hybrid aspen. Plant Cell Environ 28: 1579–1588.
- 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 Cult 77: 119–124.
- Molvig L, Rose RJ (1994) A regeneration protocol for *Spinacia oleracea* using gibberellic acid. Australian J Bot 42: 763–769.
- Mordhorst AP, Toonen MAJ, de Vries SC, Meinke D (1997). Plant embryogenesis. Crit Rev Plant Sci 16: 535–576.
- Morini S, Trinci M, Zacchini M (1991) Effect of different photoperiods on *in vitro* growth of Mr.S.2/5 plum rootstock. Plant Cell Tiss Org Cult 25: 141–145.

- Morini S, D'Onofrio C, Bellocchi G, Fisichella M (2000) Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. *Plant Cell Tiss Org Cult* 63: 47–55.
- 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.
- Moubayidin L, Perilli S, Dello Ioio R, Di Mambro R, Costantino P, Sabatini S (2010) The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Curr Biol* 20: 1138–1143.
- Mullen JL, Wolverton C, Ishikawa H, Hangarter RP, Evans ML (2002) Spatial separation of light perception and growth response in maize root phototropism. *Plant Cell Environ* 25: 1191–1196.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473–497.
- Murashige T (1974) Plant propagation through tissue cultures. *Ann Rev Plant Physiol* 25: 135–166.
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1998) Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 4: 267–275.
- Nagy F, Schäfer E (2002) Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 329–355.
- Nair RR, Gupta SD (2006) High-frequency plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in black pepper (*Piper nigrum* L.). *Plant Cell Rep* 24: 699–707.
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006) Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* 140: 411–432.
- Nakayama I, Miyazawa T, Kobayashi M, Kamiya Y, Abe H, Sakurai A (1990) Effects of a new plant growth regulator prohexadione calcium (BX-112) on shoot elongation

- caused by exogenously applied gibberellins in rice (*Oriza sativa* L.) seedlings. *Plant Cell Physiol* 31: 195–200.
- Nakayama M, Koshioka M, Matsui H, Ohara H, Mander LN, Leitch SK, Twitchin B, Kraft-Klaunzer P, Pharis RP, Yokota T (2001) Endogenous gibberellins in immature seeds of *Prunus persica* L.: identification of GA<sub>118</sub>, GA<sub>119</sub>, GA<sub>120</sub>, GA<sub>121</sub> i GA<sub>126</sub>. *Phytochemistry* 57: 749–758.
- Nakayama N, Smith RS, Mandel T, Robinson S, Kimura S, Boudaoud A, Kuhlemeier C (2012) Mechanical regulation of auxin-mediated growth. *Curr Biol* 22: 1468–1476.
- 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.
- Nelissen H, Rymen B, Jikumaru Y, Demuynck K, Van Lijsebettens M, Kamiya Y, Inzé D, Beemster GTS (2012) Local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Curr Biol* 22: 1183–1187.
- Nešković M, Radojević Lj (1973) The growth of and morphogenesis in tissue cultures of *Spinacia oleracea* L. *Bull Inst Jard Bot Univ Beograd* 8: 35–37.
- Nešković M, Čulafić Lj (1988) Spinach (*Spinacia oleracea* L.). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 6 : Crops II. Springer – Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 370–383.
- Nic-Can GI, Lopez-Torres A, Barredo-Pool F, Wrobel K, Loyola-Vargas VM, Rojas-Herrera R, De-la-Pena C (2013) New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS ONE* 8: e72160.
- Nielsen K, Boston RS (2001) Ribosome-inactivating proteins: A plant perspective. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 785–816.
- Nieves N, Sagarra F, González R, Lezcano Y, Cid M, Blanco MA, Castillo R (2008) Effect of exogenous arginine on sugarcane (*Saccharum* sp.) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and proline. *Plant Cell Tiss Org Cult* 95: 313–320.

- Nikolić R, Mitić N, Ninković S, Nešković M (2007) Efficient genetic transformation of *Lotus corniculatus* L. using a direct shoot regeneration protocol, stepwise hygromycin B selection, and a super-binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. Arch Biol Sci 59: 311–317.
- Nikolić R, Mitić N, Ninković S, Vinterhalter B, Zdravković-Korać S, Nešković M (2010) Gibberellic acid promotes *in vitro* regeneration and shoot multiplication in *Lotus corniculatus* L. Plant Growth Regul 62: 181–188.
- 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) Experiment androgenesis in *Nicotiana*. Phytomorphol 19:389-404.
- Nodine MD, Bartel DP (2010) MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. Gene Dev 24: 2678–2692.
- 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 R (2009) Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTORLIKE KINASE1* (*SERK1*) gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. J Exp Bot 60: 1759–1771.
- Nomura K, Komamine A (1995) Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 249–265.
- Nounjan N, Nghia PT, Theerakulpisut P (2012) Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. J Plant Physiol 169: 596–604.
- Nozue K, Covington MF, Duek PD, Lorrain S, Fankhauser C, Harmer SL, Maloof JN (2007) Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. Nature 448: 358–361.

- Ochatt SJ, Sangwan RS, Marget P, Assoumou Ndong Y, Rancillac M, Perney P (2002) New approaches towards the shortening of generation cycles for faster breeding of protein legumes. *Plant Breed* 121: 436–440.
- Ochatt SJ, Sangwan RS (2008) *In vitro* shortening of generation time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 93: 133–137.
- 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 Aca Sci USA* 96: 13839–13844.
- Oh E, Yamaguchi S, Kamiya Y, Bae G, Chung WI, Choi G (2006) Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *Plant J* 47: 124–139.
- Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I, Lee H-S, Sun TP, Kamiya Y, Choi G (2007) PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 19: 1192–1208.
- Olsnes S (2004) The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon* 44: 361–370.
- O'Neill DP, Ross JJ (2002) Auxin regulation of the gibberellin pathway in pea. *Plant Physiol* 130: 1974–1982.
- O'Neill DP, Davidson SE, Clarke VC, Yamauchi Y, Yamaguchi S, Kamiya Y, Reid JB, Ross JJ (2010) Regulation of the gibberellin pathway by auxin and DELLA proteins. *Planta* 232: 1141–1149.
- Onodera Y, Yonaha I, Masumo H, Tanaka A, Niikura S, Yamazaki S, Mikami T (2011) Mapping of the genes for dioecism and monoecism in *Spinacia oleracea* L. : evidence that both genes are closely linked. *Plant Cell Rep* 30: 965–971.
- Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 405: 462–466.
- Ozbay A, Özgen M (2010) Is heterosis noticeable in the callus response of winter durum wheat F<sub>1</sub> hybrids? *Biologia Plant* 54: 769–772.

- Pádua VIM, Fernandes ID, De Oliveira DE, Mansur E (1998) Effects of auxin and light treatments of donor plants on shoot production from indica-type rice (*Oryza sativa* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34: 285–288.
- Palomo-Ríos E, Barceló-Muñoz A, Mercado JA, Pliego-Alfaro F (2012) Evaluation of key factors influencing *Agrobacterium* - mediated transformation of somatic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 109: 201–211.
- 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.
- Paparelli E, Parlanti S, Gonzali S, Novi G, Mariotti L, Ceccarelli N, van Dongen JT, Kölling K, Zeeman SC, Perata P (2013) Nighttime sugar starvation orchestrates gibberellin biosynthesis and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 3760–3769.
- Park YD, Ronis DH, Boe AA, Cheng ZM (1995) Plant regeneration from leaf tissue of four North Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Am J Potato Res* 72: 329–338.
- Park SW, Lawrence CB, Linden JC, Vivanco JM (2002) Isolation and characterization of a novel ribosome-inactivating protein from root cultures of pokeweed and its mechanism of secretion from roots. *Plant Physiol* 130: 164–178.
- Park E, Kim J, Lee Y, Shin J, Oh E, Chung WI, Liu JR, Choi G (2004) Degradation of Phytochrome Interacting Factor 3 in phytochrome-mediated light signaling. *Plant Cell Physiol* 136: 968–975.
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydın 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.
- Pavlek P, Durman P, Horgas D, Heneberg R, Cvjetković B, Maceljski M, Seiwerth V, Brčić J, Pavlek V (1982) Špinat-*Spinacia oleracea*. Sveučilišna naklada Liber, Zagreb.

- Penfield S, Josse EM, Kannangara R, Gilday AD, Halliday KJ, Graham IA (2005). Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr Biol* 15: 1998–2006.
- Penfield S, Li Y, Gilday AD, Graham S, Graham IA (2006) *Arabidopsis* ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *Plant Cell* 18: 1887–1899.
- Pernisová M, Klíma P, Horák J, Válková M, Malbeck J, Souček P, Reichman P, Hoyerová K, Dubová J, Friml J, Zažímalová E, Hejátko J (2009) Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 3609–3614.
- Perry SE, Nichols KW, Fernandez DE (1996) The MADS domain protein AGL15 localizes to the nucleus during early stages of seed development. *Plant Cell* 8: 1977–1989.
- Petrášek J, Friml J (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* 136: 2675–2688.
- Peumans WJ, Hao Q, Van Damme EJM (2001) Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J* 15: 1493–1506.
- Pieric R, Millenaar FF, Peeters AJM, Voesenek LACJ (2005) New perspectives in flooding research: the use of shade avoidance and *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* 96: 533–540.
- Pfeiffer A, Nagel MK, Popp C, Wüst F, Bindics J, Viczián A, Hiltbrunner A, Nagy F, Kunkel T, Schäfer E (2012) Interaction with plant transcription factors can mediate nuclear import of phytochrome B. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 5892–5897.
- Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NEJ, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P (1995) Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 108: 1049–1057.
- 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.
- Priyono, Florin B, Rigoreau M, Ducos JP, Sumirat U, Mawardi S, Lambot C, Broun P, Pétiard V, Wahyudi T, Crouzillat 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 Cult 72: 43–51.
- Radi A, Lange T, Niki T, Koshioka M, Pimenta Lange MJ (2006) Ectopic expression of pumpkin gibberellin oxidases alters gibberellin biosynthesis and development of transgenic *Arabidopsis* plants. Plant Physiol 140: 528–536.
- Radojević, Lj. (1978) *In vitro* induction of androgenic plantlets in *Aesculus hippocastanum*. Protoplasma 96: 369–374.
- Raemakers CJJM, Jacobsen E, Visser RGF (1995) Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. Euphytica 81: 93–107.
- Raina SK, Zapata FJ (1997) Enhanced anther culture efficiency of indica rice (*Oryza sativa* L.) through modification of the culture media. Plant Breed 116: 305–315.
- 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 Cult 100: 31–37.
- Ram PC, Singh BB, Singh AK, Ram P, Singh PN, Singh HP, Boamfa I, Harren F, Santosa E, Jackson MB, Setter TL, Reuss J, Wade LJ, Singh VP, Singh RK (2002) Submergence tolerance in rainfed lowland rice: physiological basis and prospects for cultivar improvement through marker-aided breeding. Field Crops Res. 76: 131–152.
- Ramage CM, Williams RR (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis. In Vitro Cell Dev Biol—Plant 38: 116–124.
- Redha A, Talaat A (2008) Improvement of green plant regeneration by manipulation of anther culture induction medium of hexaploid wheat. Plant Cell Tiss Org Cult 92: 141–146.
- Reid JB, Symons GM, Ross JJ (2004) Regulation of gibberellin and brassinosteroid biosynthesis by genetic, environmental and hormonal factors. In: Davies PJ (ed)



- Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 179–203.
- Reinbothe S, Reinbothe C, Lehmann J, Becker W, Apel K, Parthier B (1994) JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7012–7016.
- Reinert J (1958) Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus carotten. *Naturwissenschaften* 45: 344–345.
- Reuveni M, Evenor D (2007) On the effect of light on shoot regeneration in petunia. *Plant Cell Tiss Org Cult* 89: 49–54.
- Ribeiro DM, Araújo WL, Fernie AR, Schippers JHM, Mueller-Roeber B (2012) Action of gibberellins on growth and metabolism of *Arabidopsis* plants associated with high concentration of carbon dioxide. *Plant Physiol* 160: 1781–1794.
- Rider SD, Henderson JT, Jerome RE, Edenberg HJ, Romero-Severson J, Ogas J (2003) Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in *Arabidopsis*. *Plant J* 35: 33–43.
- Rieu I, Ruiz-Rivero O, Fernandez-Garcia N, Griffiths J, Powers SJ, Gong F, Linhartova T, Eriksson S, Nilsson O, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P (2008) The gibberellin biosynthetic genes *AtGA20ox1* and *AtGA20ox2* act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the *Arabidopsis* life cycle. *Plant J* 53: 488–504.
- Rinaldi LMR (1999) Factors affecting shoot regeneration from zygotic embryo and seedling explants of *Cycas revoluta* Thunb. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 35: 25–28.
- Rippmann JF, Michalowski CB, Nelson DE, Bohnert HJ (1997) Induction of a ribosome-inactivating protein upon environmental stress. *Plant Mol Biol* 35: 701–709.
- Robacher C (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration from Muscadine grape leaf explant. *Hort Sci* 28: 53-55.
- Rocha DI, Dornelas MC (2013) Molecular overview on plant somatic embryogenesis. *CAB Reviews* 8: 1–17.
- Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 837–858.

- Rosa YBCJ, Aizza LCB, Armanhi JSL, Dornelas MC (2013) A *Passiflora* homolog of a D-type cyclin gene is differentially expressed in response to sucrose, auxin, and cytokinin. *Plant Cell Tiss Org Cult* 115: 233–242.
- 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.
- Ross JJ, O'Neill DP, Smith JJ, Kerckhoffs LHJ, Elliott RC (2000) Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J* 21: 547–552.
- Ross JJ, O'Neill DP, Rathbone DA (2003) Auxin–gibberellin interactions in pea: integrating the old with the new. *J Plant Growth Regul* 22: 99–108.
- Rossel JB, Wilson IW, Pogson BJ (2002) Global changes in gene expression in response to high light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130: 1109–1120.
- Rudus I, Kepczynska E, Kepczynski J (2002) Regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis by gibberellins. *Plant Growth Regul* 36: 91–95.
- Ruppel NJ, Hangarter RP, Kiss JZ (2001) Red-light-induced positive phototropism in *Arabidopsis* roots. *Planta* 212: 424–430.
- Rymen B, Sugimoto K (2012) Tuning growth to the environmental demands. *Curr Opin Plant Biol* 15: 683–690.
- 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. *Genes Dev* 15: 581–590.
- Salisbury FJ, Hall A, Grierson CS, Halliday KJ (2007) Phytochrome coordinates *Arabidopsis* shoot and root development. *Plant J* 50: 429–438.
- Santos D, Feveireiro P (2002) Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 70: 155–161.
- Sarnowska EA, Rolicka AT, Bucior E, Cwiek P, Tohge T, Fernie AR, Jikumaru Y, Kamiya Y, Franzen R, Schmelzer E, Porri A, Sacharowski S, Gratkowska DM, Zugaj DL, Taff A, Zalewska A, Archacki R, Davis SJ, Coupland G, Koncz C, Jerzmanowski A, Sarnowski TJ (2013) DELLAinteracting SWI3C core subunit of switch/sucrose

- nonfermenting chromatin remodeling complex modulates gibberellin responses and hormonal cross talk in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 163: 305–317.
- Sawada Y, Katsumata T, Kitamura J, Kawaide H, Nakajima M, Asami T, Nakaminami K, Kurahashi T, Mitsunashi W, Inoue Y, Toyomasu T (2008) Germination of photoblastic lettuce seeds is regulated via the control of endogenous physiologically active gibberellin content, rather than of gibberellin responsiveness. *J Exp Bot* 59: 3383–3393.
- 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.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KFX, 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.
- Schupan W, Bengssaten B, Bosund J, Hylmo B (1967) Nitrate accumulation in spinach. *Qual Plat Mat Veget* 14: 317–330.
- Seguí-Simarro JM, Nuez F (2008) How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiol Plantarum* 134: 1–12.
- Seguí-Simarro JM (2010) Androgenesis revisited. *Bot Rev* 76: 377–404.
- Shani E, Weinstain R, Zhang Y, Castillejo C, Kaiserli E, Chory J, Tsien RY, Estelle M (2013) Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of *Arabidopsis* root. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 4834–4839.
- Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A (2006) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiol Plantarum* 127: 519–534.
- Sharma SK, Millam S, Hein I, Bryan GJ (2008a) Cloning and molecular characterisation of a potato SERK gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta* 228: 319–330.

- Sharma SK, Millam S, Hedley PE, McNicol J, Bryan GJ (2008b) Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: an auxin led perspective. *Plant Mol Biol* 68: 185–201.
- Shaw PJ, Brown JW (2004) Plant nuclear bodies. *Curr Opin Plant Biol* 7: 614–620.
- Shen Y, Khanna R, Carle CM, Quail PH (2007) Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation. *Plant Physiol* 145: 1043–1051.
- Shenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199–204.
- Shibukawa T, Yazawa K, Kikuchi A, Kamada H (2009) Possible involvement of DNA methylation on expression regulation of carrot LEC1 gene in its 5'-upstream region. *Gene* 437: 22–31.
- Silva ALL, Rodriguez C, Costa JL, Machado MP, Penha RO, Buasi LA, Vanderberghe LPS, Soccol CR (2013) Gibberellic acid fermented extract obtained by solid – state fermentation using citric pulp by *Fusarium moniliforme*: Influence on *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated *in vitro*. *Pak J Bot* 45: 2057–2064.
- 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 tissue culture *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* 11: 118–131.
- Smith DL, Krikorian AD (1990a) pH control of carrot somatic embryogenesis. In: Nijkamp HJJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J (eds) *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 449–453.
- Smith DL, Krikorian AD (1990b) Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. *Plant Cell Rep* 9: 34.

- Somleva MN, Schmidt EDL, de Vries S (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (*Poaceae*) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep* 19: 718–726.
- 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.
- Song S, Qi T, Wasternack C, Xie D (2014) Jasmonate signaling and crosstalk with gibberellin and ethylene. *Curr Opin Plant Biol* 21: 112–119.
- Soriano M, Li H, Jacquard C, Angenent GC, Krochko J, Offringa R, Boutiliera K (2014) Plasticity in cell division patterns and auxin transport dependency during *in vitro* embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Cell* 26: 2568–2581.
- Stasolla C, Yeung EC (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74: 15–35.
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W (2005) Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17: 616–627.
- Stavang JA, Lindgard B, Ernsten A, Lid SE, Moe R, Olsen JE (2005) Thermoperiodic stem elongation involves transcriptional regulation of gibberellin deactivation in pea. *Plant Physiol* 138: 2344–2353.
- Steward FC, Mapes MO, Smith J (1958) Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. *Am J Bot* 45: 707–708
- Stirpe F, Gasperi-Campani A, Barbieri L, Falasca A, Abbondanza A, Stevens WA (1983) Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree). *Biochem J* 216: 617–625.
- Stirpe F, Barbieri L (1986) Ribosome-inactivating proteins up to date. *FEBS Lett* 195:1– 8.
- Stripe F (2004) Ribosome inactivating proteins. *Toxicon* 44: 371–383.
- Stripe F (2005) Ribosome inactivating proteins. In: Wiley RG, Lapi DA (eds) *Molecular neurosurgery with targeted toxins*. Humana Press Inc, Totowa, NJ, pp. 9–29.

- Stirpe F, Battelli MG (2006) Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell Mol Life Sci* 63: 1850–1866.
- Stitt M, Muller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible WR, Krapp A (2002) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot* 53: 959–970.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11806–11811.
- Stone SL, Braybrook SA, Paula SL, Kwong KW, Meuser J, Pelletier J, Hsieh TF, Fischer 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.
- 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.
- Subotić A, Jevremović S, Trifunović M, Petrić M, Milošević S, Grubišić D (2009) The influence of gibberellic acid and paclobutrazol on induction of somatic embryogenesis in wild type and hairy root cultures of *Centaureum erythraea* Gillib. *Afr J Biotechnol* 8: 3223–3228.
- Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM (2010) *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell* 18: 463–471.
- Sun YL, Hong SK (2010) Effects of plant growth regulators and L-glutamic acid on shoot organogenesis in the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 100: 317–328.
- Sunderland N, Dunwell JM (1977) Anther and pollen culture. In: Street HE (ed) *Plant tissue and cell culture*, 2nd edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 223–265.
- Suo H, Ma Q, Ye K, Yang C, Tang Y, Hao J, Zhang ZJ, Chen M, Feng Y, Nian H (2012) Overexpression of *AtDREB1A* causes a severe dwarf phenotype by decreasing

- endogenous gibberellin levels in soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. PLoS ONE 7: e45568.
- Supena EDJ, Winarto B, Riksen T, Dubas E, van Lammeren A, Offringa R, Boutilier K, Custers J (2008) Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning. J Exp Bot 59: 803–814.
- Suwanaketchanatit C, Piluek J, Peyachoknagul S, Huehne PS (2007) High efficiency of stable genetic transformation in *Dendrobium* via microprojectile bombardment. Biol Plant 51: 720–727.
- 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.
- 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 53: 971–977.
- Talon M, Zeevaart JAD, Gage DA (1991) Identification of gibberellins in spinach and effects of light and darkness on their levels. Plant Physiol 97: 1521–1526.
- Tanaka S, Mochizuki N, Nagatani A (2002) Expression of the *AtGH3a* gene, an *Arabidopsis* homologue of the soybean *GH3* gene, is regulated by phytochrome B. Plant Cell Physiol 43: 281–289.
- Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, Cheng Y, Lim J, Zhao Y, Ballaré CL, Sandberg G, Noel JP, Chory J (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. Cell 133: 164–176.
- Taylor RL (1967) The foliar embryos of *Malaxis paludosa*. Can J Bot 45: 1553–1556.

- Tepperman JM, Hwang YS, Quail PH (2006) phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of *Arabidopsis* seedling de-etiolation. *Plant J* 48: 728–742.
- Thakare D, Tang W, Hill K, Perry SE (2008) The MADS-domain transcription regulator AGAMOUS-LIKE15 promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiol* 146: 1663–1672.
- Thibaud-Nissen F, Shealy RT, Khanna A, Vodkin LO (2003) Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiol* 132: 118–136.
- Thomas W, Hoffmann F, Potrycus I, Wenzel G (1976) Protoplast regeneration and stem embryogenesis of haploid androgenic rape. *Mol Gen Genet* 145: 245–247.
- Thomas SG, Phillips AL, Hedden P (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4698–4703.
- Thomas C, Bronner R, Molinier J, Prinsen E, van Onckelen H, Hahne G (2002) Immunocytochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflower embryos. *Planta* 215: 577–583.
- Thomas C, Meyer D, Hember C, Steinmetz A (2004) Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiol Biochem* 42: 35–42.
- Thomas TD (2006) Effect of sugars, gibberellic acid and abscisic acid on somatic embryogenesis in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill. *Chin J Biotech* 22: 465–471.
- Thorpe TA (2000) Somatic embryogenesis: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *Korean J Plant Tiss Cult* 27: 245–258.
- Thorpe T, Stasolla C, Yeung EC, de Klerk GJ, Roberts A, George FF (2008) The components of plant tissue culture media II : organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) *Plant propagation by tissue culture, Vol. 1: The Background*, 3<sup>rd</sup> edn. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 115–173.



- Titapiwatanakun B, Murphy AS (2009) Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *J Exp Bot* 60: 1093–1107.
- Toonen MAJ, Hendriks T, Schmidt EDL, Verhoeven HA, Van Kammen A, de Vries SC (1994) Description of somatic embryo forming single-cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* 194: 565–572.
- Touraev A, Ilham A, Vicente O, Heberle-Bors E (1996) Stress induced microspore embryogenesis in tobacco an optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep* 15: 561–565.
- Touraev A, Vicente O, Heberle-Bors E (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci* 2: 297–302.
- Touraev A, Pfosser M, Heberle-Bors E (2001) The microspore: a haploid multipurpose cell. *Adv Bot Res* 35: 53–109.
- Tubić Lj, Anačkov G, Milojević J, Ghalawenji N, Mitić N, Igić R, Zdravković-Korać S (2014) High variability in the tissue culture response of root-tips of *Allium ascalonicum* individuals and optimization of the regeneration procedure. *Plant Cell Tiss Org Cult* 118: 101–110.
- Tulecke WR (1953) A tissue derived from pollen of *Ginkgo biloba*. *Science* 117: 599-600.
- Ubeda-Tomas S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster GT, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ (2008) Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat Cell Biol* 10: 625–628.
- Ubeda-Tomás S, Federici F, Casimiro I, Beemster GTS, Bhalerao R, Swarup R, Doerner P, Haseloff J, Bennett MJ (2009) Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Curr Biol* 19: 1194–1199.
- Uddenberg D, Valladares S, Abrahamsson M, Sundström JF, Sundås-Larsson A, von Arnold S (2011) Embryogenic potential and expression of embryogenesis-related genes in conifers are affected by treatment with a histone deacetylase inhibitor. *Planta* 234: 527–539.

- Ueda M, Zhang Z, Laux T (2011) Transcriptional activation of *Arabidopsis* axis patterning genes WOX8/9 links zygote polarity to embryo development. *Dev Cell* 20: 264–270.
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing C, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M (2005) *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437: 693–698.
- Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Katoh E, Ohmiya H, Asano K, Saji S, Hongyu X, Ashikari M, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M (2007) Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, *GID1*, with a rice *DELLA* protein, *SLR1*, and gibberellin. *Plant Cell* 19: 2140–2155.
- Van Staden J, Zazimalova E, George EF (2008) Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) *Plant propagation by tissue culture, Vol. 1: The Background*, 3<sup>rd</sup> edn. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 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.
- Verdeil JL, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci* 12: 245–252.
- Vergne P, Dumas C (2000) Genes normally expressed in the endosperm at early stages of microspore embryogenesis in maize. *Plant Mol Biol* 44: 559–574.
- Vestman D, Larsson E, Uddenberg D, Cairney J, Clapham D, Sundberg E, von Arnold S (2011) Important processes during differentiation and early development of somatic embryos of Norway spruce as revealed by changes in global gene expression. *BMC Proc* 5: P78.
- Voesenek LACJ, Benschop JJ, Bou J, Cox MCH, Groeneveld HW, Millenaar FF, Vreeburg RAM, Peeters AJM (2003) Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant dicot *Rumex palustris*. *Ann Bot* 91: 205–211.

- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Kyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69: 233–249.
- Vriezen WH, Zhou Z, van der Straeten D (2003) Regulation of submergence-induced shoot elongation in *Oriza sativa* L. *Ann Bot* 91: 263–270.
- Walsh TA, Morgan AE, Hey TD (1991) Characterization and molecular cloning of a novel type 2 ribosome – inactivating protein from maize – novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8 – kilodalton internal peptide segment. *J Biol Chem* 266: 23422–23427.
- Wang H, Caruso LV, Downie AB, Perry SE (2004) The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *Plant Cell* 16: 1206–1219.
- Wang P, Wang G, Ji J (2005) Embryogenesis and regeneration from different of vegetable soybean. *Soybean Sci* 24: 314–316.
- Wang B, Peng DX, Sun ZX, Zhang N, Gao SM (2008) *In vitro* plant regeneration from seedling-derived explants of ramie (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 44: 105–111.
- Wang F, Zhu D, Huang X, Li S, Gong Y, Yao Q, Fu X, Fan LM, Deng XW (2009) Biochemical insights on degradation of *Arabidopsis* DELLA proteins gained from a cell-free assay system. *Plant Cell* 21: 2378–2390.
- Weston DE, Elliott RC, Lester DE, Rameau C, Reid JB, Murfet IC, Ross JJ (2008) The pea (*Pisum sativum*) DELLA proteins LA and CRY are important regulators of gibberellin synthesis and root growth. *Plant Physiol* 147: 199–205.
- White PR (1943) A handbook of plant tissue culture. 1<sup>st</sup> edn. Jacques Cottell Press, Lancaster, Pennsylvania, USA.
- Wild M, Davière JM, Cheminant S, Regnault T, Baumberger N, Heintz D, Baltz R, Genschik P, Achard P (2012) The *Arabidopsis* DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *Plant Cell* 24: 3307–3319.
- Willemsen V, Scheres B (2004) Mechanisms of pattern formation in plant embryogenesis. *Annu Rev Genet* 38: 587–614.

- Williams EG, Maheshwaran 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 Dyn* 128: 113–120.
- Willige BC, Isono E, Richter R, Zourelidou M, Schwechheimer C (2011) Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23: 2184–2195.
- Willmann MR, Mehalick AJ, Packer RL, Jenik PD (2011) MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 155: 1871–1884.
- Willy J, Peumans QH, Els JM, Van Damme (2001). Ribosome – inactivating proteins from plants: more than RNA – N-glycosidase? *The FASEB Journal* 15: 1493–1506.
- Wingler A (2015) Comparison of signaling interactions determining annual and perennial plant growth in response to low temperature. *Frontiers Plant Sci* 5: 794.
- Wójcikowska B, Jaskoła 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 Cult* 121: 255–258.
- Wolbang CM, Ross JJ (2001) Auxin promotes gibberellin biosynthesis in decapitated tobacco plants. *Planta* 214: 153–157.
- Wolbang CM, Chandler PM, Smith JJ, Ross JJ (2004) Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellins in barley stems. *Plant Physiol* 134: 769–776.
- Wu K, Li L, Gage DA, Zeevaart JAD (1996) Molecular cloning and photoperiod-regulated expression of gibberellin 20-oxidase from the long-day plant spinach. *Plant Physiol* 110: 547–554.

- Wu XM, Liu MY, Ge XX, Xu Q, Guo WW (2011) Stage and tissuespecific modulation of ten conserved miRNAs and their targets during somatic embryogenesis of Valencia sweet orange. *Planta* 233: 495–505.
- Xiao XG, Branchard M (1993) Embryogenesis and plant regeneration of spinach (*Spinacia oleracea* L.) from hypocotyls segments. *Plant Cell Rep* 13: 69–71.
- Xiao XG, Branchard M (1995) *In vitro* high frequency plant rgeneration from hypocotyl and root segments of spinach by organogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 42: 239–244.
- Xiao XG, Charles G, Branchard M (1997) Plant regeneration from cell suspension of spinach. *Plant Cell Tiss Org Cult* 49: 89–92.
- Xu H, Liu Q, YaoT, Fu X (2014) Shedding light on integrative GA signaling. *Curr Opin Plant Biol* 21: 89–95.
- Yamaguchi R, Nakamura M, Mochizuki N, Kay SA, Nagatani A (1999) Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *J Cell Biol* 145: 437–445.
- Yamaguchi S (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59: 225–251.
- Yamamoto A, Yoshii M, Murase S, Fujita M, Kurata N, Hobo T, Kagaya Y, Takeda S, Hattori T (2014) Cell-by-cell developmental transition from embryo to post-germination phase revealed by heterochronic gene expression and ER-body formation in *Arabidopsis* leafy cotyledon mutants. *Plant Cell Physiol* 55: 2112–2125.
- Yamashino T (2003) A link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 44: 619–629.
- Yang DL, Yao J, Mei CS, Tong XH, Zeng LJ, Li Q, Xiao LT, Sun TP, Li J, Deng XW, Lee CM, Thomashow MF, Yang Y, He Z, He SY (2012) Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E1192–E1200.

- Yang X, Wang L, Yuan D, Lindsey K, Zhang X (2013) Small RNA and degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. *J Exp Bot* 64:1521–1536.
- Yarbough JA (1932) Anatomical and developmental studies of the foliar embryos of *Bryophyllum calcinum*. *Am J Bot* 19: 443–453.
- Yasin M, Butt MS, Anjum FM, Shahid M (2013) Nutritional and antioxidant profiling of vitamin K dietary sources. *Pak J Nutri* 12: 996–1002.
- Yasin M, Butt MS, Yasmin A, Bashir S (2014) Chemical, antioxidant and sensory profiling of vitamin K-rich dietary sources. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 57: 153-160.
- Yazawa K, Takahata K, Kamada H (2004) Isolation of the gene encoding carrot leafy cotyledon1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Physiol Biochem* 42: 215–223.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134–145.
- Yepes LM, Aldwinckle HS (1994) Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 37: 257–269.
- Yeung EC, Rahman MH, Thorpe TA (1996) Comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L cv. Topas. I. Histodifferentiation. *Int J Plant Sci* 157: 27–39.
- Yokawa K, Kagenishi T, Kawano T, Mancuso S, Baluška F (2011) Illumination of *Arabidopsis* roots induces immediate burst of ROS production. *Plant Signal Behavior* 6: 1460–1464.
- You XL, Yi JS, Choi YE (2006) Cellular change and callose accumulation in zygotic embryos of *Eleutherococcus senticosus* caused by plasmolyzing pretreatment result in high frequency of single-cell-derived somatic embryogenesis. *Protoplasma* 227: 105-112.
- Zambryski P, Crawford K (2000) Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Ann Rev Cell Dev Biol* 16: 393–421.

- Zdravković-Korać S, Nešković M (1998) Organogenesis and somatic embryogenesis in *Spinacia oleracea* tissue culture. Arch Biol Sci Belgrade 50: 183–188.
- Zdravković-Korać S, Nešković M (1999) Induction and development of somatic embryos from spinach (*Spinacia oleracea*) leaf segments. Plant Cell Tiss Org Cult 55: 109–114.
- Zdravković-Korać S, Čalić-Dragosavac D, Uzelac B, Janošević D, Budimir S, Vinterhalter B, Vinterhalter D (2008) Secondary somatic embryogenesis versus caulogenesis from somatic embryos of *Aesculus carnea* Hayne.: developmental stage impact. Plant Cell Tiss Org Cult 94: 225–231.
- Zeevaart JAD, Gage DA (1993) *ent*-kaurene biosynthesis is enhanced by long photoperiods in the long-day plants *Spinacia oleracea* L. and *Agrostemma githago* L. Plant Physiol 101: 25–29.
- Zeevaart JAD, Gage DA, Talon M (1993) Gibberellin A<sub>1</sub> is required for stem elongation in spinach. Proc Natl Acad Sci USA 90: 7401–7405.
- Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, Sun TP (2007) Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. Plant Cell 19: 3037–3057.
- Zhang HX, Zeevaart JAD (1999) An efficient *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation and regeneration system for cotyledons of spinach (*Spinacia oleracea* L.). Plant Cell Report 18: 640–645.
- Zhang P, Legris G, Coulin P, Puonti-Kaerlas J (2000) Production of stable transformed cassava plants via particle bombardment. Plant Cell Rep 19: 939–945.
- Zhang P, Puonti-Kaerlas J (2000) PIG-mediated cassava transformation using positive and negative selection. Plant Cell Rep 19: 1041–1048.
- Zhang BH, Liu F, Liu ZH, Wang HM, Yao CB (2001) Effects of kanamycin on tissue culture and somatic embryogenesis in cotton. Plant Growth Regul 33: 137–149.
- Zhang T, Cao ZY, Wang XY (2005) Induction of so-matic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon and hypocotyls explants of *Eruca sativa* Mill. In Vitro Cellular Developmental Biology—Plant 41: 655–657.

- Zhang S, Liu X, Lin Y, Xie G, Fu F, Liu H, Wang J, Gao S, Lan H, Rong T (2011a) Characterization of a *ZmSERK* gene and its relationship to somatic embryogenesis in a maize culture. *Plant Cell Tiss Org Cult* 105: 29–37.
- Zhang ZL, Ogawa M, Fleet CM, Zentella R, Hu J, Heo J-O, Lim J, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sun TP (2011b) Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 2160–2165.
- Zhang D, Jing Y, Jiang Z, Lin R (2014) The chromatin-remodeling factor PICKLE integrates brassinosteroid and gibberellin signaling during skotomorphogenic growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 2472–2485.
- Zhao X, Yu X, Foo E, Symons GM, Lopez J, Bendehakkalu KT, Xiang J, Weller JL, Liu X, Reid J, Lin C (2007) A study of gibberellin homeostasis and cryptochrome-mediated blue light inhibition of hypocotyl elongation. *Plant Physiol* 145: 106–118.
- Zhao Y (2008) The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 11: 16–22.
- 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 Cult* 112: 65–74.
- 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 Y, Ren N, Wang H, Stromberg AJ, Perry SE (2009) Global identification of targets of the *Arabidopsis* MADS domain protein AGAMOUS-Like15. *Plant Cell* 21: 2563–2577.
- Zheng Q, Perry SE (2014) Alterations in the transcriptome of soybean in response to enhanced somatic embryogenesis promoted by orthologs of AGAMOUS-Like15 and AGAMOUS-Like18. *Plant Physiol* 164: 1365–1377.
- Zheng W, Zhang X, Yang Z, Wu J, Li F, Duan L, Liu C, Lu L, Zhang C, Li F (2014) AtWuschel promotes formation of the embryogenic callus in *Gossypium hirsutum*. *PLoS ONE* 9: e87502.



- Zhou C.H, Labbe H, Sridha S, Wang L, Tian L, Latoszek-Green M, Yang Z, Brown D, Miki B, Wu KQ (2004) Expression and function of HD2-type histone deacetylases in *Arabidopsis* development. *Plant J* 38: 715–724.
- Zhu C, Perry SE (2005) Control of expression and autoregulation of AGL15, a member of the MADS-box family. *Plant J* 41: 583–594.
- Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411–23.
- Zouine JE, Hadrami I (2007) Effect of 2,4-D, glutamine and BAP on embryogenic suspension culture of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Sci Hortic* 112: 221–226.
- 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, Pocięcha E, Bączek-Kwinta R, Płazek A (2014) Antioxidant activity and ROS tolerance in triticale (x *Triticosecale* Wittm.) anthers affect the efficiency of microspore embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 119: 79–94.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Milojević je rođena 17. oktobra 1984. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2003/2004. godine na studijskoj grupi Biologija. Redovne studije je završila 2008. godine sa prosečnom ocenom 9.81, čime je stekla zvanje mastera bioloških nauka. U periodu 2007-2008. godine je bila stipendista Zadužbine "Đoke Vlajkovića" Univerziteta u Beogradu. Doktorske studije na modulu Fiziologija i molekularna biologija biljaka Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2009/2010. godine.

Jelena Milojević je od februara 2010. godine zaposlena u Odelejenju za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja "Sinša Stanković" u Beogradu. Maja 2011. godine je izabrana u zvanje istraživač-saradnik.

Tokom istraživačke karijere Jelena Milojević je bila angažovana na dva projekta Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije u okviru osnovnih istraživanja - "Regulacija morfogeneskih procesa i sekundarnog metabolizma i genetičke transformacije biljaka u kulturi *in vitro*" (ON143026B) u periodu 2006–2010. godine i "Biotehnologija *in vitro* – gajene, lekovite i ugržene biljne vrste" (ON173015) u periodu 2011-2015. godine.

Koautor je 50 publikacija, od toga 11 u uglednim međunarodnim časopisima. Dva rada iz doktorske disertacije Jelene Milojević su istaknuta kao značajan doprinos oblasti biotehnologije biljaka u pregledu štampe "Agricell Report" (<http://www.agritechpublications.com/argenl.htm>). Dobitnik je i nagrade za najbolju poster prezentaciju mladog istraživača na simpozijumu nacionalnog značaja.

Jelena Milojević je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije (DFBS) i Federacije evropskih udruženja za biologiju biljaka (The Federation of European Societies of Plant Biology – FESPB). Saradnik je Centra za talente u Beogradu, čiji je uspešni polaznik i sama bila, gde učestvuje u približavanju naučnog poziva učenicima osnovnih i srednjih škola.