UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Katarina B. Ćuković

IDENTIFIKACIJA I ANALIZA EKSPRESIJE GENA UKLJUČENIH U SOMATSKU EMBRIOGENEZU KIČICE (*Centaurium erythraea* Rafn.)

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Katarina B. Ćuković

IDENTIFICATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF GENES INVOLVED IN SOMATIC EMBRYOGENESIS OF CENTAURY (*Centaurium erythraea* Rafn.)

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Komisija za odbranu doktorske disertacije

Mentori: _____

dr Milica Bogdanović, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković"
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

_____

dr Svetlana Radović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije: _____

dr Slađana Todorović, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković"
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

_____

dr Dušica Janošević, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

_____

dr Tijana Cvetić Antić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu.

Najdublju zahvalnosti dugujem svojoj mentorki dr Milici Bogdanović za njen neumorni trud, strpljenje i nesebično deljenje svog znanja. Kroz njeno mentorstvo naučila sam koliko je važna dobra organizacija u radu, a zahvaljujući rečima podrške uspela sam da istrajem do kraja. Ono što je najvažnije, znala sam da u trenucima neizvesnosti uvek mogu da se oslonim na nju u bilo kom segmentu izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se i mentorki dr Svetlani Radović na prijatnoj višegodišnjoj saradnji i korisnim savetima koji su doprineli kvalitetu teksta disertacije.

Najiskreniju zahvalnost dugujem dr Slađani Todorović za njen aktivni doprinos u osmišljavanju i realizaciji eksperimentalnog dela disertacije, kao i na korisnim sugestijama tokom procesa pisanja. Njeno bogato iskustvo i mudri saveti su mi pomogli da napredujem kao istraživač, a naši razgovori tokom „lekovitih ručkova“ su bili od neprocenjive pomoći u raznim životnim situacijama.

Neizmernu zahvalnost upućujem dr Milanu Dragićeviću za pomoć pri statističkoj analizi podataka i predstavljanju rezultata, bez koje ova disertacija ne bi dobila svoj trenutni oblik. Naše interesantne diskusije su me dodatno motivisale, a njegov smisao za humor uvek bi mi popravio raspoloženje.

Našoj dr Ani Simonović, koja mi neizmerno nedostaje, najdublje zahvaljujem što me je primila u svoj tim i pružila priliku da se bavim ovim poslom. Posebno cenim iskrenu majčinsku ljubav i toplinu koju sam uvek osećala kod nje.

Zahvaljujem se dr Dušici Janošević i dr Tijani Cvetić Antić na izdvojenom vremenu za čitanje ove doktorske disertacije i korisnim sugestijama koje su učinile tekst boljim.

Zahvaljujem svim kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka na prijatnoj radnoj atmosferi. Veliku zahvalnost dugujem dr Biljani Filipović na angažovanju u realizaciji eksperimenata u oblasti gajenja biljaka i kalusa kičice in vitro u cilju prikupljanja materijala za sekvenciranje transkriptoma lista, korena, embriogenog kalusa, somatskih embriona i adventivnih pupoljaka, kao i izolaciji RNK iz pomenutih tkiva. Hvala dr Branislavu Šileru na semenima kičice pomoću kojih sam započela eksperimente i dr Angelini Subotić na pomoći u izradi histoloških preparata somatskih embriona kičice i pomoći pri mikroskopiji. Hvala dr Danijeli Paunović na lepoj saradnji tokom izrade eksperimentalnog dela disertacije i što je uvek bila tu da odgovori na moja pitanja oko procedura vezanih za doktorat. Hvala i mojim dragim koleginicama Katarini Hočevar i Ljiljani Radovanović, za naše male trenutke opuštanja u pauzama ispred instituta kada su uz smeh svi naši problemi doktoranada postajali lakši.

Veliko hvala mom Marku za svu ljubav koju mi pruža i neizmernu podršku tokom izazovnih meseci pisanja teze.

Na kraju, želim da izrazim duboku zahvalnost svojoj porodici, posebno roditeljima, Svetlani i Božidaru i bratu Milošu, koji su moja sigurna luka i koji su svojom ljubavlju učinili da se svakog dana osećam voljeno i sigurno. Ovu tezu posvećujem njima.

Identifikacija i analiza ekspresije gena uključenih u somatsku embriogenezu kičice (*Centaurium erythraea* Rafn.)

Sažetak

Kičica (*Centaurium erythraea* Rafn.) je lekovita biljka koja lako regeneriše putem somatske embriogeneze (SE) u uslovima *in vitro*. U cilju identifikacije gena sa ulogom u SE, sekvencirano je šest različitih tkiva kičice i *de novo* sastavljen transkriptom koji je funkcionalno anotiran prema *NCBI nt*, *Swissprot* i *PFAM* bazama podataka sa obogaćivanjem prema *KOG* i *GO* bazama. Analizom ekspresije 11 *housekeeping* gena u tkivima i organima različitih faza razvića utvrđeno je da su ribozomalni protein L2 (*RPL2*) i TATA-vezujući protein 1 (*TBP1*) optimalni referentni geni sa najstabilnijom ekspresijom tokom SE. U transkirptomu su identifikovani potencijalni geni markeri SE čija je ekspresija evaluirana u kolekciji tkiva i organa. Među njima se naročito izdvojila specifična ekspresija do sada nepoznatog transkripta *CeNA1* u embriogenom kalusu, što ga čini potencijalnim markerom rane faze SE. Mapiranjem sekvence transkirpta na genom kičice pronađeno je sedam članova *CeNA1* genske familije sa intaktnim ORF-om, čije su sekvence promotora *in silico* analizirane i utvrđena je egzon-intron struktura gena. Takođe, *in silico* je određena unutarćelijska lokalizacija i 3D struktura proteina CeNA1. Sekundarna i ciklična SE kod kičice je indukovana primenom 2,4-D i CPPU. Podloga koja sadrži 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU omogućila je tri ciklusa SE i pokazala se optimalnom u pogledu broja primarnih somatskih embriona koji formiraju sekundarne embrione i broja i morfologije sekundarnih embriona po eksplantatu. Sekundarni embrioni sa imali visoku stopu klijavosti i konverzije u biljke i dodatno su histološki analizirani. Utvrđeno je da se ekspresija *CeNA1* gena povećava u embriogenom tkivu tokom prelaska iz primarne ka prvom ciklusu sekundarne SE, a potom ostaje relativno nepromenjena. Pored toga, potvrđen je efekat genotipa na regenerativnu sposobnost embriogenog kalusa, pri čemu ekspresija odabranih gena, uključujući *CeNA1*, opada sa porastom diferenciranosti embriogenog tkiva.

Ključne reči: *Centaurium erythraea* Rafn., kičica, somatska embriogeneza, diferencijalno eksprimirani geni, *CeNA1*, sekundarna somatska embriogeneza

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija i molekularna biologija biljaka

Identification and expression analysis of genes involved in somatic embryogenesis of centaury (*Centaurium erythraea* Rafn.)

Abstract

Centaurium erythraea Rafn. is a medicinal plant that easily regenerates through somatic embryogenesis (SE) *in vitro*. In order to identify genes involved in SE, six different centaury tissues were sequenced resulting in a assembly of a *de novo* transcriptome, which was functionally annotated against NCBI nt, Swissprot and PFAM databases with enrichment according to KOG and GO databases. Analysis of the expression of 11 housekeeping genes in tissues and organs at various developmental stages revealed that ribosomal protein L2 (*RPL2*) and TATA-binding protein 1 (*TBP1*) are optimal reference genes with the most stable expression during SE. In the transcriptome, potential SE marker genes were identified whose expression was evaluated in a collection of tissues and organs. Among them, the highly specific expression of the so far unknown *CeNA1* transcript in the embryogenic callus stood out, which makes it a potential marker of the early stage of SE. By mapping the transcript sequence on the centaury genome, seven members of the *CeNA1* gene family with an intact ORF were found, whose promoter sequences were analyzed *in silico* and the exon-intron structure of the gene was determined. Additionally, the intracellular localization and 3D structure of the CeNA1 protein was determined *in silico*. Secondary and cyclic SE in centaury were induced using 2,4-D and CPPU. A medium containing 0,1 mgl^{-1} 2,4-D and 0,25 mgl^{-1} CPPU allowed three cycles of SE and proved to be optimal in terms of the number of primary somatic embryos forming secondary embryos and the number and morphology of secondary embryos per explant. Secondary embryos with a high rate of germination and conversion into plants were additionally histologically analyzed. It was observed that *CeNA1* gene expression increases in embryogenic tissue during the transition from primary to the first cycle of secondary SE, and then remained relatively stable. Furthermore, the effect of genotype on the regenerative capacity of the embryogenic callus was confirmed, whereby the expression of selected genes, including *CeNA1*, decreased with the increase in differentiation of the embryogenic tissue.

Key words: *Centaurium erythraea* Rafn., kičica, centaury, somatic embryogenesis, differentially expressed genes, *CeNA1*, secondary somatic embryogenesis

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Plant Physiology and Molecular Biology

Lista skraćenica

2,4-D – 2,4-dihlorfenoksisirćetna kiselina

6-BA – 6-benziladenin

18S – 18S ribozomalna RNK

βGlcY – β-D-glukozil Yariv histohemijski reagens

β-ME – 2-merkaptoetanol

ABA – abscisinska kiselina

AED – opšti indikator kvaliteta anotacije gena iz genoma (engl. „*Annotation Edit Distance*“)

AGP – arabinogalaktanski proteini

ak – aminokiselina

amiRNA – veštačka mikroRNK (engl. „*Artificial microRNA*“)

AuxRe – auksinski responsivni elementi

ANT – antranilat

AK – adenozin kinaza

Aux/IAA – familija gena povezanih sa auksinom (engl. „*Auxin/Indoleacetic Acid*“)

AGL15 – agamusu sličan protein 15 (engl. „*Agamous-Like 15*“)

apk – uzorak adventivnih pupoljaka formiran na eksplantatima korenova na podlozi bez regulatora rastenja

rl – uzorak listova rozete indukovan na podlozi bez regulatora rastenja

aplh – uzorak adventivnih pupoljaka formiranih na eksplantatima listova na MS podlozi sa 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU

apl – uzorak adventivnih pupoljaka obrazovanih na eksplantatima listova na MS podlozi bez regulatora rastenja

Asp – asparaginska kiselina

BAP – 6-benzilaminopurin

BBM – transkripcioni faktor (engl. „*Baby Boom*“)

bp – bazni par

BR – brasinosteroidi

BUSCO – analiza pokrivenosti transkriptoma (engl. „*Benchmarking Universal Single- Copy Orthologs*“)

CAT – katalaza

cDNK – komplementarni lanac DNK

CPPU – N-fenil-N'-(2-hloro-4-piridil) urea

Ct – broj potrebnih ciklusa za detekciju fluorescentnog signala (engl. „*Cycle threshold*“)

COOLAIR – dugačka nekodirajuća RNK koja učestvuje u vernalizaciji (engl. „*Cold Induced Long Antisense Intragenic RNAs*“)

COLDAIR – dugačka nekodirajuća RNK koja učestvuje u vernalizaciji (engl. „*Cold Assisted Intronic Noncoding RNA*“)

CePR10 – protein iz PR10 porodice alergena

CeRNS3 – ribonukleaza 3

CeDC2.15-like – DC2.15 proteinu sličan

CeGRP3-like – glicinom bogatom proteinu 3 sličan

CePCC13-62-like – PCC13-62 proteinu sličan protein

CeACS3 – ACS sintaza 3

CeTLP1-like – taumatinu sličan protein 1

CeTAR1 – triptofan aminotransferaza 1

CeIAA32 – IAA32 iz *Aux/IAA* porodice gena

CeGH3.6 – grečen Hagen 3

CeAGL65-like – protein sa MADS boks domenom sličan Agamusu 65

CeYUC7 – flavin monooksigenaza 7

CeSERK1 – serin-treonin kinaza 1

CeSERK – serin-treonin kinaza

CeNA1 – nepoznati protein 1

CeNA2 – nepoznati protein 2

CeNA4 – nepoznati protein 4

CDK – kinaze zavisne od ciklina (engl. „*Cyclin-dependent kinases*“)

CMT3 – hromometilaza 3

DEPC – dietilpirokarbonat

DEG – diferencijano eksprimirani geni

dikamba – 2-metoksi-3,6-dihlorbenzoeva kiselina

DNaza I – enzim dezoksiribonukleaza I

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DRM2 – metiltransferaza 2

DRP – proteini povezani sa desikacijom (engl. „*Desiccation-Related Proteins*“)

DSE – direktna somatska embriogeneza

dsRNK – dvolančana RNK (engl. „*Double-stranded RNA*“)

EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina

EF2 – elengacioni faktor 2

ek – uzorak embriogenog kalusa koji se obrazovao na eksplantatima listova na MS podlozi sa dodatkom 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU

FLC – gen *FLC* (engl. „*Flowering Locus C*“)

FPKM – normalizovane vrednosti ekspresije (engl. „*Fragments Per Kilobase of target transcript length per Million reads mapped*“)

GLP – germinu slični proteini (engl. „*Germin-like proteins*“)

GA – giberelini

GH3 – amidosintetaze acilne kiseline (engl. „*Gretchen Hagen 3*“)

GO – termini za opisivanje funkcija gena (*engl*. „*Gene Ontology*“)

gse – uzorak globularnog embriona formiran na eksplantatima listova na MS podlozi sa 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU

H3 – histon 3

HAT – histon acetiltranferaza

HDAC – histon deacetilaza

IAA – indol-3-sirćetna kiselina

IAAld – indol-3-acetaldehid

IAM – indol-3-acetamid

IAOx – indol-3-acetaldehid oksim

IDR – regioni proteina koji su inherentno neuređeni (engl. „*Intrinsically disordered regions*“)

IGP – indol-3-glicerol fosfat

IBA – indol-3-buterna kiselina

IPA – indol-3-piruvat

ISE – indirektna somatska embriogeneza

JA – jasmonska kiselina

kb – kilobaza

kDa – kilodalton

KIN – kinetin

kk – uzorak korenova iz kulture korenova formiran na eksplantatima listova na MS podlozi bez regulatora rastenja

kl – uzorak klijanaca

KOG – proteinska baza ortologa (engl. „*Eukaryotic orthologous groups*“)

kse – uzorak embriona u kotiledonarnom stadijumu koji se obrazovao na eksplantatima listova na MS podlozi sa 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU

LTP – proteini lipidnog transfera (engl. „*Lipid transfer proteins*“)

LLR – ponavljanja bogata leucinom u strukturnim motivima proteina (engl. „*Leucine Rich Repeat*“)

LEA – motivi u aminokiselinskim sekvencama (engl. „*Late Embryogenesis Abundant*“); LEA proteini

lncRNK – Dugačke nekodirajuće RNK (engl. „*Long non-coding RNA*“)

LP – lisne primordije (engl. „*Leaf primordia*“)

Mbp – megabaza

MET1 – DNK metiltransferaza

miRNK – mikroRNK

MS – *Murashige & Skoog* hranljiva podloga

NA – transkript bez dostupne anotacije (engl. „*Not Applicable*“)

NAA – α-naftil sirćetna kiselina

ncRNK – nekodirajući RNK molekul

NGS – tehnike sekvenciranja druge generacije (engl. „*Next generation sequencing*“)

Nt – nukleotid

NTC – negativna kontrola bez DNK (engl. „*No Template Control*“)

OCT1 – mitohondrijalna intermedijarna peptidaza (engl. „*Organic Cation Transporter 1*“)

OD – optička gustina (engl. „*Optical Density*“)

ok – uzorak organogenog kalusa koji se obrazovao na eksplantatima listova na MS podlozi obogaćenoj sa 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU

ORF – otvoreni okvir čitanja (engl. „*Open Reading Frame*“)

PB – provaskularne trake (engl. „*Provascular bands*“)

pcl – uzorak listova cvetalih biljaka iz prirode

PCR - lančana reakcija polimeraze (engl. „*Polymerase chain reaction*”)

pcs – uzorak stabljika cvetalih biljaka iz prirode

pck – uzorak korenova cvetalih biljaka iz prirode

PEM – proembriogena masa

PHB/PHV – geni iz *HD-ZIP III* familije (engl. „*Phabulosa/Phavoluta“*)

pikloram – 4-amino-3,5,6-trihloropiridin-2-karboksilna kiselina

PKL – epigenetički faktor koji sprečava somatske ćelije da ispolje osobine embriona (engl. „*Pickle*“)

pLDDT – mera pouzdanosti 3D struktura proteina preko *AlphaFold* (engl. „*Predicted Local Distance Difference Test*“)

pnc – uzorak nezrelih (zatvorenih) cvetova biljaka iz prirode

POX – peroksidaza klase III

PPR – pentatrikopeptidna ponavljanja u proteinskim domenima (engl. "*Pentatricopeptide Repeats*")

PR – proteini povezani sa patogenima (engl. „*Pathogenesis-Related*")

PRC1;2 – Polikomb represivni kompleks (engl. „*Polycomb Repressive Complex 1;2*")

PRZ1 – faktor diferencijacije (engl. „*Proporz1*")

pzc – uzorak zrelih (otvorenih) cvetova biljaka iz prirode

qPCR – kvantitativni PCR u realnom vremenu (engl. „*quantitative real-time PCR*")

RADaR – repozitorijum arhiviranih digitalnih radova Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković"

RAN – RAS-povezani nukleusni protein

RdDM – RNK usmerena DNK metilacija (engl. „*RNA-directed DNA methylation"*)

RIN – mera integriteta RNK (engl. „*RNA Integrity Number"*)

RISC – RNK-indukovani kompleks utišavanja gena

rk – uzorak korenova rozete

RNAi – RNK inteferencija (engl. „*RNA Interference*")

RNA-seq – sekvenciranje RNK visoke propusnosti (engl. „*High-throughput RNA sequencing"*)

RNK – ribonukleinska kiselina

RPL2 – Ribozomalni protein L2

RRB – regulatori rastenja biljaka

rRNK – ribozomalna RNK

ROS – reaktivne vrste kiseonika

RSEM – alat za kvantifikaciju transkripata (engl. „*RNA-Seq by Expectation Maximization*")

SA – salicilna kiselina

SAM – apikalni meristem izdanaka (engl. „*Shoot apical meristem*")

SE – somatska embriogeneza

se – somatski embrion

SERK – transmembranske receptorne kinaze (engl. "*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*")

siRNK – male interferišuće RNK (engl. „*small interfering RNA*“)

SMRT – tehnika sekvenciranja pojedinačnog molekula u realnom vremenu (engl. „*single molecule real-time*“)

snRNK – male nukleusne RNK (engl. „*Small nuclear RNA*“)

sncRNK – male nekodirajuće RNK (engl. „*Small non-coding RNA*“)

snoRNK – male nukleolusne RNK (engl. „*Small nucleolar RNA*“)

SOD – superoksid dismutaza

SOD1 – gvožđe-superoksid dismutaza 1

SOD2 – gvožđe-superoksid dismutaza 2

SP – signalni peptid

TAM – triptamin

TBP1 – TATA-vezujući protein 1

TCHHL1 – trihohijalin 1 (engl. „*Trichohyalin-like protein 1*“)

TF – transkripcioni faktor

tip-A ARR – citokininski geni, tip A (engl. „*Type-A Arabidopsis Response Regulator*“)

tip-B ARR – citokininski geni, tip B (engl. „*Type-B ARR*“)

tRNK – transportna RNK

Tris – hidroksimetil-aminometan

Trp – triptofan

TRP3/TSA1 – α-subjedinica triptofan sintaze

TRP2/TSB1 – β-subjedinica triptofan sintaze

TUA – α-tubulin

TUB – β-tubulin

UTR – netranslatirani region

WUS – transkripcioni faktor sa homodomenom koji je uključen u uspostavljanje organizacionog centra apikalnog meristema izdanka (engl. „*Wuschel*“)

Sadržaj

1. Uvod ... 1
1.1. Regeneracija biljaka *in vitro* ... 1
1.1.1. Somatska embriogeneza ... 2
1.2. Aspekti biosinteze, transporta, razgradnje i signalnih puteva auksina ... 4
1.3. Efekat auksina na indukciju somatske embriogeneze ... 6
1.3.1. Efekat egzogene primene auksina ... 7
1.4. Efekat regulatora rastenja na ekspresiju gena za transkripcione faktore povezane sa SE ... 8
1.5. Epigenetička regulacija somatske embriogeneze ... 10
1.6. Upotreba funkcionalne genomike u cilju identifikacije novih biljnih gena ... 11
1.7. Nekodirajuće RNK i RNK interferencija ... 15
1.8. *Gateway* kloniranje radi pravljenja genskih konstrukata ... 18
1.9. Opšte odlike *Centaurium erythraea* Rafn. ... 19
1.10. Istraživanja somatske embriogeneze kod kičice ... 21
1.10.1. SE indukovana na eksplantatima korenova ... 21
1.10.2. SE indukovana na eksplantatima listova ... 22
1.10.3. Uloga antioksidativnih enzima tokom SE ... 22
1.10.4. Ispitivanja uloge AGP proteina tokom SE u kičici ... 23
2. Cilj rada ... 24
3. Materijal i metode ... 25
3.1. Biljni materijal korišćen u eksperimentima ... 25
3.1.1. Prikupljanje materijala *Centaurium erythraea* Rafn. iz prirode ... 25
3.1.2. Uspostavljanje kulture *in vitro* ... 25
3.1.3. Indukcija somatske embriogeneze i organogeneze *in vitro* ... 25
3.1.4. Kolekcija tkiva i organa za potrebe sekvenciranja transkriptoma i ispitivanja ekspresije *housekeeping* i diferencijalno eksprimiranih gena tokom SE ... 26
3.1.5. Indukcija sekundarne somatske embriogeneze ... 27
3.1.6. Indukcija ciklične somatske embriogeneze ... 28
3.1.7. Klijanje somatskih embriona ... 29
3.1.8. Histološka analiza sekundarnih somatskih embriona ... 29
3.1.9. Evaluacija kapaciteta za sazrevanje embriona u različitim genotipovima ... 29
3.2. Sekvenciranje transkriptoma *Centaurium erythraea* Rafn. ... 29
3.2.1. Sekvenciranje i *de novo* sastavljanje transkriptoma ... 29
3.2.2. Funkcionalna anotacija transkriptoma ... 30
3.2.3. Deponovanje podataka iz projekta sekvenciranja transkriptoma *C. erythraea* Rafn. ... 31
3.2.4. Odabir tkivno-specifičnih i diferencijalno eksprimiranih gena iz transkriptoma kičice ... 32
3.3. Molekularno-biološke metode ... 32
3.3.1. Izolacija RNK ... 32
3.3.2. Tretman dezoksiribonukleazom ... 34
3.3.3. Reverzna transkripcija ... 34

3.3.4. Konstrukcija prajmera za *housekeeping* gene i gene sa pretpostavljeno diferencijalnom ekspresijom tokom SE ... 34
3.3.5. PCR amplifikacije ... 38
3.3.6. Elektroforeza na agaroznom gelu ... 41
3.3.7. Izolacija DNK produkata iz agaroznog gela radi primene u eksperimentima kloniranja i pripreme standarda za RT-PCR reakcije ... 41
3.3.8. Kvantitativni RT-PCR u realnom vremenu ... 42
3.4. Evaluacija ekspresije odabranih genskih kandidata ... 42
3.4.1. Evaluacija stabilnosti ekspresije *housekeeping* gena i gena sa potencijalnom ulogom u SE u kolekciji tkiva kičice ... 42
3.4.2. Evaluacija ekspresije odabranih gena iz transkriptoma u embriogenom tkivu genotipova sa varijabilnim kapacitetom za diferencijaciju ... 44
3.4.3. Evaluacija ekspresije *CeNA1* gena tokom ciklične SE ... 44
3.5. Uslovi gajenja bakterijskih kultura i bakterijski sojevi ... 44
3.6. Dizajn i konstrukcija vektora za utišavanje gena ... 45
3.6.1. Dizajn *amiRNA* sekvence ... 45
3.6.2. Gateway kloniranje ... 46
3.6.3. Sekvenciranje plazmidne DNK radi provere tačnosti kloniranja ... 51
3.6.4. Pravljenje kompetentnih bakterijskih ćelija ... 52
3.6.5. Transformacija bakterija elektroporacijom ... 52
3.7. *In silico* analiza genskih i proteinskih homologa CeNA1 ... 52
3.7.1. Sekvence gena i proteina CeNA1 ... 52
3.7.2. *In silico* predikcija strukture gena *CeNA1*, analiza promotora i vezivnih mesta za transkripcione faktore ... 53
3.7.3. *In silico* karakterizacija CeNA1 proteina kičice ... 53
4. Rezultati ... 54
4.1. Uspostavljanje kolekcije tkiva i organa kičice ... 54
4.2. Sekvenciranje transkriptoma *C. erythraea* Rafn. ... 55
4.2.2. Kvantifikacija zastupljenosti transkripata ... 57
4.2.3. Funkcionalna anotacija transkriptoma ... 57
4.3. Izbor adekvatnih referentnih gena u različitim fazama razvića kičice ... 62
4.3.1. Evaluacija ekspresije *housekeeping* gena u kolekciji tkiva ... 62
4.3.2. Analiza stabilnosti ekspresije *housekeeping* gena pomoću *geNorm* i *NormFinder* softvera ... 63
4.4. Identifikacija potencijalnih gena markera SE i evaluacija njihove ekspresije ... 65
4.4.1. Identifikacija pretpostavljeno diferencijalno eksprimiranih gena tokom SE i organogeneze u transkriptomu ... 65
4.4.2. Izbor potencijalnih molekularnih markera SE u transkriptomu kičice ... 68
4.4.3. Evaluacija ekspresije pretpostavljeno diferencijalno eksprimiranih gena u kolekciji tkiva kičice ... 74
4.5. Sekundarna i ciklična somatska embriogeneza kod *C. erythraea* ... 82
4.5.1. Indukcija primarne SE na eksplantatima listova *C. erythraea* i eksperimentalna postavka u cilju indukcije sekundarne i cikične SE ... 82
4.5.2. Indukcija sekundarne SE ... 82

4.5.3. Histologija sekundarne SE ... 83
4.5.4. Efekat 2,4-D i CPPU na indukciju sekundarne SE ... 84
4.5.5. Indukcija ciklične SE ... 87
4.5.6. Klijanje sekundarnih somatskih embriona ... 90
4.5.7. Ekspresija *CeNA1* gena tokom ciklične SE ... 90
4.6. Evaluacija uticaja genotipa na regenerativnu sposobnost embriogenog kalusa i ekspresije odabranih gena u embriogenom tkivu genotipova sa različitom regenerativnom sposobnošću ... 91
4.7. Kloniranje *CeNA1 amiRNA* konstrukata ... 94
4.7.1. Dizajniranje i konstrukcija vektora za utišavanje gena ... 94
4.8. *In silico* analiza gena i proteina CeNA1 ... 99
4.8.1. Karakteristike gena *CeNA1* ... 99
4.8.2. Analiza promotora *CeNA1* gena ... 103
4.8.3. Karakteristike proteina CeNA1 ... 107
4.8.4. Predikcija N-terminalnog peptida i unutarćelijske lokalizacije proteinskih homologa CeNA1 ... 108
4.8.5. Tercijarna struktura proteina CeNA1 ... 109
5. Diskusija ... 111
5.1. Opšte karakteristike transkriptoma *C. erythraea* Rafn. ... 111
5.2. Funkcionalna anotacija transkriptoma ... 112
5.3. Procena stabilnosti ekspresije *housekeeping* gena u kolekciji tkiva i organa kičice ... 113
5.4. Identifikacija i validacija ekspresije pretpostavljeno diferencijalno eksprimiranih gena tokom SE iz transkriptoma kičice ... 115
5.5. Indukcija sekundarne i ciklične SE ... 126
5.6. Uticaj genotipa na regenerativnu sposobnost embriogenog kalusa i ekspresija odabranih gena u embriogenom tkivu genotipova sa različitom regenerativnom sposobnošću ... 130
5.7. *In silico* analiza gena i proteina CeNA1 ... 131
5.7.1. *In silico* analiza gena i promotora *CeNA1* ... 131
5.7.2. *In silico* analiza proteina CeNA1 ... 133
5.7.3. Transkript *CeNA1* - potencijalni član klase lncRNK molekula ... 135
5.8. Buduće perspektive za funkcionalnu karakterizaciju *CeNA1* transkripta ... 138
6. Zaključci ... 139
7. Literatura ... 140
8. Prilozi ... 176
8.1. Ekspresija odabranih gena iz transkriptoma u uzorcima listova pre induktivnog tretmana i nakon četiri nedelje od indukcije SE ... 176

1. Uvod

1.1. Regeneracija biljaka *in vitro*

Biljke poseduju izraženu plastičnost u razviću koja im omogućava ne samo kontinuiranu diferencijaciju novih organa, već i sposobnost regeneracije nakon povrede ili tokom gajenja *in vitro* (Ikeuchi i sar. 2016). Sposobnost fiziološkog obnavljanja, reparacije ili zamene tkiva omogućava regeneraciju kompletne biljke iz diferenciranog organa, tkiva, mase kalusa, pa čak i iz jedne ćelije (Ikeuchi i sar. 2016). U osnovi regeneracije leži totipotentnost ili pluripotentnost ćelija, što odražava visoku plastičnost biljnih ćelija. Totipotentnost se odnosi na sposobnost određenih ćelija da se diferenciraju u potpuno razvijeni organizam, dok pluripotentnost podrazumeva diferencijaciju grupe tkiva ili organa iz jedne ćelije (Verdeil i sar. 2007). *In vitro* kultura tkiva je prvi put predložena kao koncept pre više od jednog veka od strane Haberlandt-a (1902), predstavljajući regeneraciju kompletnih biljaka *Tradescantia virginiana* iz somatskih ćelija u kontrolisanim *in vitro* uslovima. Od tada su tehnike kulture tkiva značajno napredovale, a jedna od ključnih prekretnica bilo je otkriće Skoog-a i Miller-a (1957) da relativne koncentracije auksina i citokinina igraju ključnu ulogu u regeneraciji adventivnih korenova i izdanaka. Ova pionirska otkrića otvorila su vrata daljem razvoju tehnika kulture tkiva koje se mogu primeniti u različitim oblastima istraživanja kao što su mikropropagacija i genetičko inženjerstvo (Ikeuchi i sar. 2016).

Na regeneraciju biljaka *in vitro* utiče više faktora, uključujući regulatore rastenja biljaka (RRB) (Çabuk i Özgen 2016, Gerdakaneh i sar. 2020), sastav hranljive podloge (Sundararajan i sar. 2017, Chimdessa 2020), svetlosni režim (Li i sar. 2002, Bhatia i sar. 2015) i tip početnog eksplantata (Dhar i Joshi 2005, Minutolo i sar. 2020). Osim toga, kultura tkiva biljaka pokazuje snažnu zavisnost od biljne vrste i genotipa. Recimo, neke biljke poput duvana (*Nicotiana tabacum*), *Arabidopsis thaliana* i pirinča (*Oryza sativa*) mogu lako regenerisati *in vitro*, dok su druge biljke, poput soje (*Glycine max*), pšenice (*Triticum aestivum*) i kukuruza (*Zea mays*), teže za regeneraciju. Takođe, japanske sorte pirinča pokazuju veću sposobnost formiranja kalusa u odnosu na indijske sorte (Abe i Futsuhara 1986). Razjašnjavanje genetičke osnove sposobnosti regeneracije biljaka u kontrolisanom okruženju može dovesti do povećanja stope regeneracije i efikasnosti genetičke transformacije.

Semenice mogu regenerisati *in vitro* putem reparacije tkiva, somatske embriogeneze i organogeneze (Long i sar. 2022). Reparacija tkiva se odnosi na sposobnost mladih tkiva, poput vrhova korenova ili listova, da repariraju oštećene delove i često se koristi u tehnici vegetativnog razmnožavanja reznicama (Xu i Huang 2014). Dve najčešće metode regeneracije biljaka u kontrolisanim uslovima su SE i organogeneza (Hill i Schaller 2013). Ova dva procesa dele neke zajedničke karakteristike - oba se oslanjaju na totipotentnost somatskih ćelija, koje nakon percepcije spoljašnjih stimulusa, prolaze kroz reprogramiranje genske ekspresije kada dolazi do dediferencijacije i sticanja organogene ili embriogene kompetencije, što za posledicu ima začetak i razviće organa (Karami i sar. 2009, Yang i Zhang 2010). I SE i organogeneza mogu se odvijati sa ili bez stadijuma kalusiranja (npr. indirektno ili direktno) i mogu se desiti spontano (bez egzogeno dodatih RRB) ili biti indukovane primenom RRB (Long i sar. 2022).

1.1.1. Somatska embriogeneza

Somatska embriogeneza predstavlja način regeneracije biljaka tokom koga se somatske ćelije indukuju da promene pravac razvića i kada nastaju embriogene ćelije, koje zatim putem embriogenog razvića formiraju somatske embrione i, naposletku, kompletne biljke (Zimmerman 1993, Verdeil i sar. 2007). Somatski embrion, **se**, je struktura formirana bez fertilizacije koja liči i koja prolazi kroz slične morfološke faze kao zigotski embrion: globularni (**gse**), srcasti, torpedo i kotiledonarni (**kse**) embrion kod dikotila (**Slika 1.**), odnosno globularni, skutelarni i stadijum koleoptila kod monokotila (Zhao i sar. 2017). Somatski embrioni su često krupniji i sastoje se od većeg broja ćelija, ali imaju manje organizovani površinski sloj u poređenju sa njihovim zigotskim ekvivalentima (Xu i Bewley 1992, Dodeman i sar. 1997, Suhasini i sar. 1997, Jin i sar. 2014). Ovo je najverovatnije posledica nedostatka materinskih tkiva i endosperma koji regulišu rast i razviće embriona unutar semenog zametka (Ohto i sar. 2009).

SE može biti direktna (DSE), bez kalusne međufaze, ili indirektna (ISE), tokom koje se formira kalusno tkivo (Long i sar. 2022). Embriogeni kalus (**ek**) je neorganizovana masa dediferenciranih ćelija koje se intezivno dele i koje su sposobne da promene svoj obrazac razvića, najčešće u odgovoru na hormone i stres (Phillips 2004). U kalusu se nalaze embriogene ćelije koje su najčešće sitne, izodijametričnog oblika i imaju krupan nukleus, sitne vakuole, citoplazmu bogatu organelama, debele ćelijske zidove i povećanu metaboličku aktivnost (Yang i Zhang 2010). Tokom DSE, ćelije eksplantata prolaze kroz češće i kompaktnije deobe (Horstman i sar. 2017), što dovodi do formiranja ispupčenja koja na kraju postaju morfološki prepoznatljivi embrioni koji su sposobni za regeneraciju kompletnih biljaka (Xu i Huang 2014).

Najznačajniji spoljašnji faktori koji mogu indukovati SE *in vitro* su različiti biljni hormoni i/ili stres. Uslovi stresa, kao što su izlaganje teškim metalima, ekstremnim temperaturama, osmotskom šoku i ultraljubičastom zračenju, često se koriste za indukciju SE (Cabrera-Ponce i sar. 2015, Ochatt i Revilla 2016, Salo i sar. 2016). Raznovrsnost induktivnih uslova u kulturi delimično proizilazi iz interakcije spoljašnjih faktora sa endogenim nivoima hormona u eksplantatima koji variraju u zavisnosti od genotipa, faze razvića i starosti eksplantata (Jiménez 2005).

Indirektnu SE karakteriše nekoliko faza koje su sažeto prikazane na **Slici 1.**:

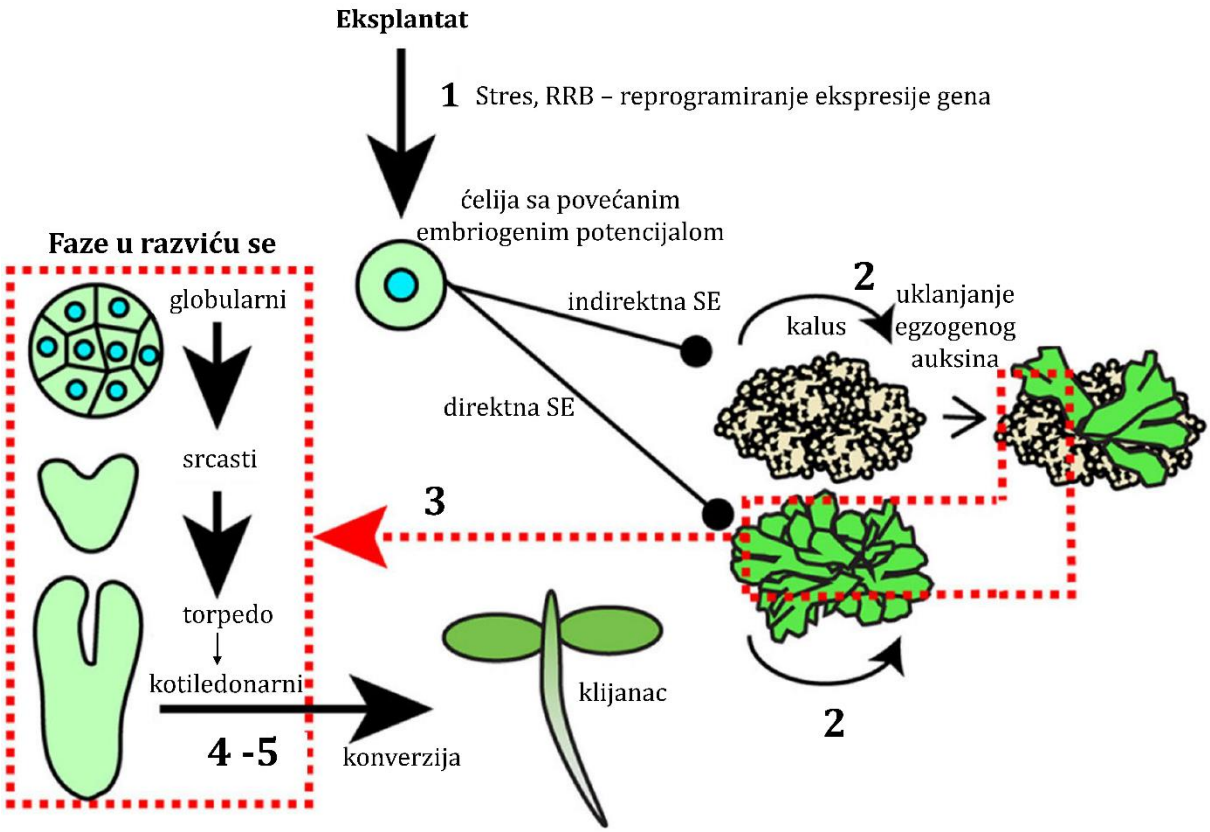
1. **Inicijacija SE i formiranje embriogenog kalusa**. U najranijoj fazi SE, somatske ćelije prolaze kroz dediferencijaciju i postaju ponovo totipotentne pod uticajem spoljašnjih faktora. Primena RRB ili izlaganje stresu dovode do masivnog reprogramiranja genske ekspresije i značajnih epigenetičkih promena koje zajedno podstiču generisanje ćelija koje su sposobne da prođu kroz tranziciju u razviću (Joshi i sar. 2022). Ovaj proces dovodi do nastanka embriogenog kalusa. Tokom dediferencijacije se povećava embriogeni potencijal ćelija, što je od suštinskog značaja za regeneraciju putem SE. U kompetentnim ćelijama koje su stekle embriogeni potencijal, aktiviraju se geni odgovorni za formiranje embriogenih ćelija (Su i sar. 2021), uključujući gene koji kodiraju za transkripcione faktore (TF) koji pokreću nizvodne kaskade signalne transdukcije (Quiroz-Figueroa i sar. 2006).

2. **Proliferacija embriogenih ćelija**. Obrazovane embriogene ćelije koje se nalaze unutar embriogenog kalusa počinju intezivno da proliferišu tako što se aktiviraju signalni putevi koji dovode do intezivnih ćelijskih deoba i menjanja pravca razvića ka meristemskom (López-Ruiz i sar. 2019).

3. **Formiranje somatskih embriona**. Ovaj korak uključuje morfološke stadijume SE koji su analogni razviću zigotskog embriona, uključujući formiranje meristema izdanka i korena. Tokom ovog koraka često se uklanja auksin iz podloge (Joshi i sar. 2022.).

4. **Sazrevanje kotiledonarnih embriona (dehidratacija, desikacija)**. Ovaj korak uključuje blagu dehidrataciju koje može prebaciti embrion iz faze razvića u fazu skladištenja rezervnih materija (ugljeni hidrati, lipidi, proteini) u cilju priprema za klijanje (Joshi i sar. 2022.).

5. ***In vitro* klijanje**. Ovu fazu karakteriše klijanje embriona, odnosno formiranje radikule i naposletku, konverzija u biljke (Joshi i sar. 2022.).



Slika 1. Faze tokom ISE. 1 - Inicijacija SE i formiranje embriogenog kalusa; 2 - Proliferacija embriogenih ćelija; 3 - Morfološki stadijumi kroz koje prolaze **se**; 4 - 5 - Sazrevanje kotiledonarnih embriona i klijanje. ISE - indirektna somatska embriogeneza, **se** - somatski embrion, RRB - regulatori rastenja biljaka. Preuzeto i modifikovano prema Joshi i sar. 2022.

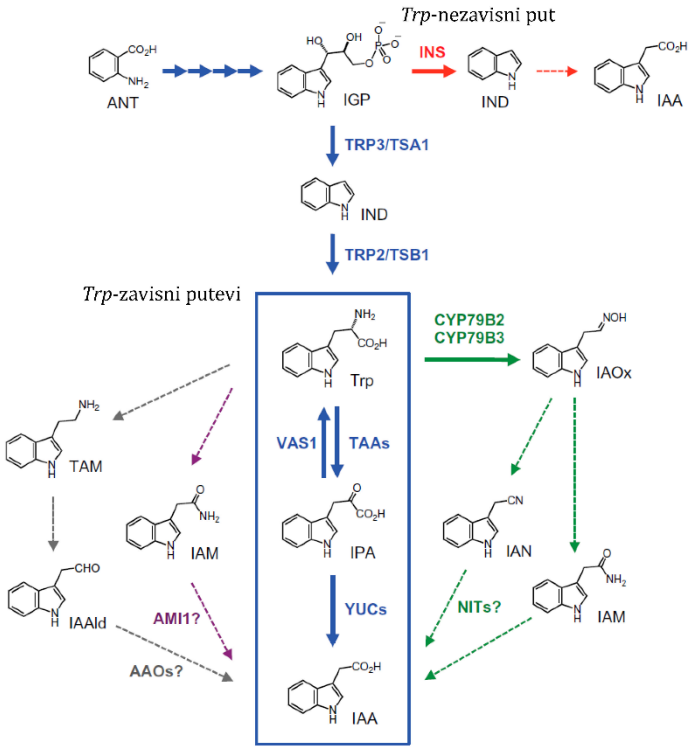
Somatski embrion nije zatvoren u materinskim tkivima, tako da se proces SE može kontrolisati u uslovima *in vitro*, a dobijeni **se** se mogu posmatrati i sakupljati u različitim fazama razvića radi molekularnih i biohemijskih analiza (Quiroz-Figueroa i sar. 2006). Zbog toga se SE koristi kao model sistem za proučavanje morfoloških, fizioloških i molekularnih aspekata embriogeneze kod viših biljaka (Quiroz-Figueroa i sar. 2006, Karami i sar. 2009), kao i za istraživanje ćelijske diferencijacije i mehanizama koji dovode do sticanja totipotentnosti u biljnim ćelijama (Fehér 2015). SE ima i različite biotehnološke primene, kao što su propagacija elitnih ili transgenih linija, dok jednoćelijsko poreklo nekih **se** može ponuditi mnoge prednosti kod oplemenjivanja (Raemakers i sar. 1995). Zahvaljujući svom visokom potencijalu za umnožavanje, SE se smatra najprikladnijom *in vitro* metodom za klonalnu propagaciju različitih biljnih vrsta (Guan i sar. 2016). Pored toga, propagacija biljaka preko SE predstavlja važan izvor materijala za transformaciju biljaka, nudeći genetički identičan početni materijal, sa manje somaklonalnog variranja u poređenju sa razmnožavanjem putem organogeneze (Giri i sar. 2004). SE takođe predstavlja najbolji put regeneracije u krio-prezervaciji (Engelmann 2011), kao i metodu izbora za proizvodnju veštačkih semena i somatskih hibrida (Karami i sar. 2009).

Somatski embrioni se takođe mogu koristiti za indukciju novog kruga SE, nazvanog sekundarna ili ciklična SE (Raemakers i sar. 1995). Sekundarna SE je proces kada se iz primarnih **se** koji se koriste kao početni eksplantati formiraju novi (sekundarni) **se**. Drugi uobičajeni nazivi za sekundarnu SE su repetitivna, ciklična, rekurentna, pomoćna ili adventivna SE. Sekundarni **se** se formiraju direktno i/ili indirektno na kotiledonima, hipokotilima, epikotilima ili vrhovima korenova primarnih **se**. Efikasni sistemi regeneracije biljaka putem sekundarne SE su prijavljeni kod nekoliko biljnih vrsta, na primer u *Cyclamen persicum* (You i sar. 2011), *Hepatica nobilis* (Szewczyk-Taranek i Pawłowska 2015), *Pseudotsuga menziesii* (Lelu-Walter i sar. 2018), *Akebia trifoliata* (Zou i sar. 2019) i *Olea europea* (Pires i sar. 2020). Sekundarna SE može poboljšati i produžiti embriogenu kompetenciju određenih linija (Lelu-Walter i sar. 2018), povećati broj dobijenih embriona u poređenju sa primarnom SE (Lelu-Walter i sar. 2018) i reciklirati **se** nepravilne morfologije koji inače ne mogu da regenerišu u normalne biljke (Ji i sar. 2017). Ovaj put razvića karakteriše visoka stopa umnožavanja, ponovljivost, nezavisnost od efekata izvora eksplantata i visok nivo uniformnosti (Karami i sar. 2009). Niska stopa umnožavanja važnih klonskih linija može se poboljšati putem sekundarne SE (Lelu-Walter i sar. 2018). Budući da kod mnogih vrsta, embriogena kompetencija u kulturi *in vitro* opada tokom vremena zbog starenja i pasažiranja tokom nekoliko meseci (Klimaszewska i sar. 2008, Pila Quinga i sar. 2017), sekundarna SE pruža način za obnavljanje embriogenog potencijala važnih linija i rutinski se koristi kod širokolisnih vrsta drveća kao metod dugoročnog održavanja (Lelu-Walter i sar. 2018).

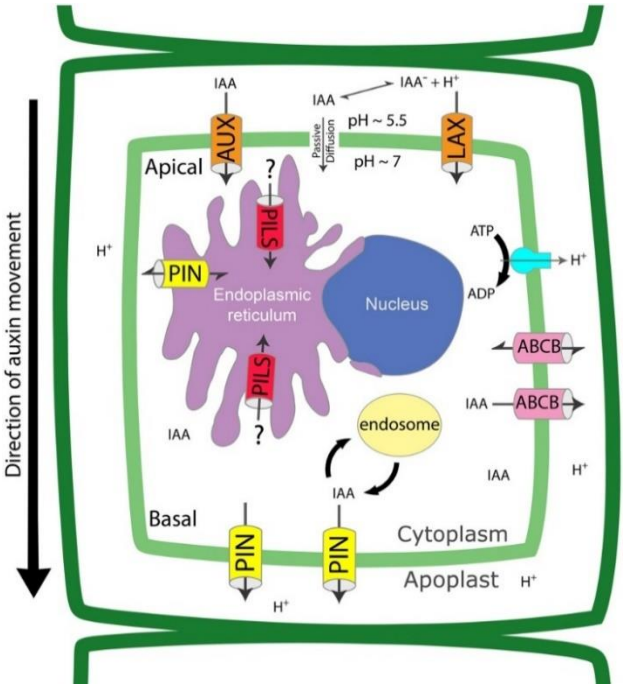
1.2. Aspekti biosinteze, transporta, razgradnje i signalnih puteva auksina

Auksini su indolna jedinjenja koja učestvuju u brojnim procesima kod biljaka, kao što su regulacija ćelijske deobe, izduživanje ćelija, razviće embriona, apikalna dominacija, rizogeneza, organogeneza i SE (Becker i Hedrich 2002). Postoji nekoliko prirodnih auksina, među kojima je indol-3-sirćetna kiselina (IAA) najzastupljenija forma kod viših biljaka (Kasahara 2015). Aspekti biosinteze, transporta, razgradnje i signalnih puteva auksina su danas u velikoj meri poznati (Benjamins i Scheres 2008). Postoji pet puteva biosinteze auksina, od kojih je jedan nezavisan od triptofana, dok su ostali triptofan-zavisni putevi. Putanja zavisna od triptofana se može odvijati na četiri načina u zavisnosti od međuprodukata dobijenih iz triptofana: putanja indol-3-piruvata (IPA), putanja indol-3-acetamida (IAM), putanja triptamina (TAM) i putanja indol-3-acetaldehid-oksima (IAOx). U IPA putu, koji je najzastupljeniji triptofan-zavisni put, triptofan se delovanjem triptofan aminotransferaze arabidopsisa/triptofan aminotransferazama sličnih proteina (TAA1/TAR) konvertuje u IPA, koji se pomoću flavin-monooksigenaza iz familije YUC (YUCCA), konvertuje u IAA (Kasahara 2015) (**Slika 2.**). Put biosinteze auksina nezavisan od triptofana podrazumeva da se IAA ne sintetiše od triptofana, već od indola i indol-3-glicerol-fosfata (IGP) (Kasahara 2015) (**Slika 2.**).

Nakon što se sintetiše, auksin se distribuira u biljci pomoću specijalizovanih transportera. Auksin je jedinstven među biljnim hormonima zbog postojanja polarnog transporta, koji je moguć zbog asimetrične lokalizacije specijalizovanih transportera na ćelijskim membranama. Članovi PIN (engl. „*Pinformed*“) i ABCB (engl. „*ATP-Binding Cassette subfamily B*“) familija proteina se nalaze samo na bazalnim stranama ćelija i odgovorni su za efluks auksina (**Slika 3.**), čime omogućuju polarni transport i uspostavljanje gradijenata koncentracije auksina (Petrásek i sar. 2006, Křeček i sar. 2009). Proteini zaduženi za influks IAA pripadaju AUX1/Like AUX1 (AUX1/LAX) familiji proteina i imaju permeaznu aktivnost (Petrásek i sar. 2006, Balzan i sar. 2014) (**Slika 3.**).



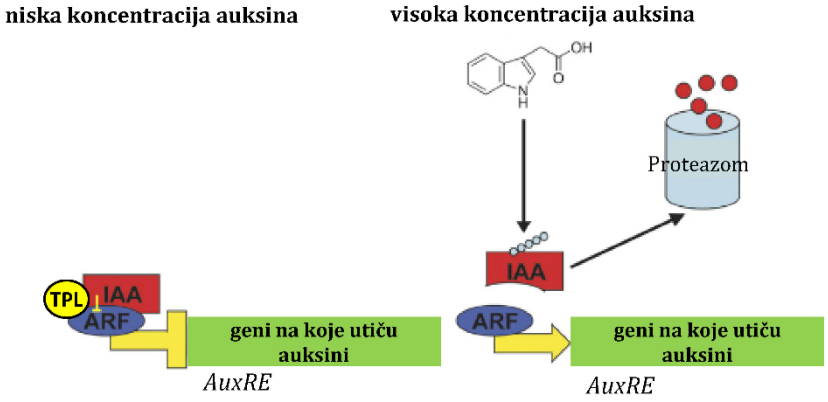
Slika 2. Biosinteza IAA u biljkama. Najzastupljeniji IPA put je obeležen plavom bojom; IAOx put je prikazan zelenom bojom; IAM put je prikazan ljubičastom bojom; TAM put je prikazan sivom bojom, dok je put nezavisan od triptofana prikazan crvenom bojom. ANT - antranilat; IGP - indol-3-glicerol-fosfat; IAA - indol-3-sirćetna kiselina; Trp - triptofan; TRP3/TSA1 - α-subjedinica triptofan-sintaze; TRP2/TSB1 - β-subjedinica triptofan-sintaze; IAM - Indol-3-acetamid; IAAld - Indol-3-acetaldehid, TAM - triptamin; IAOx - Indol-3-acetaldehid oksim; CYP79B2 i CYP79B3 - citohrom P450 monooksigenaze. Preuzeto i modifikovano prema Kasahara 2015.



Slika 3. Polarni transport auksina. Proteini iz AUX1/LAX familije se nalaze na apikalnim stranama ćelija i zaduženi su za influks IAA, dok se PIN i ABCB proteini nalaze samo na bazalnim stranama ćelija i učestvuju u efluksu IAA. Preuzeto od Balzan i sar. 2014.

Pored slobodnih auksina, u biljnim ćelijama vrlo često dolazi do konjugacije IAA sa ugljenim hidratima ili ak. Jedna od funkcija ovih kompleksa je da povećavaju dostupnost auksina kada je neophodan ćeliji, što je slučaj konjugacije sa ugljenim hidratima, koja je reverzibilna jer podleže hidrolizi (Tromas i Perrot-Rechenmann 2010). Konjugaciju sa ak obezbeđuju članovi familije proteina poznatih kao amidosintetaze acilne kiseline (engl. „*Gretchen Hagen 3*“, GH3) (Hagen i sar. 1984, Hagen i Guilfoyle 1985, Schaller i sar. 2015). Estri IAA ne podležu oksidativnoj degradaciji i na taj način štite IAA od razgradnje. Količina dostupne IAA u biljnim tkivima zavisi i od procesa degradacije. IAA se razgrađuje oksidacijom indolnog prstena ili dekarboksilacijom na bočnom lancu. Enzimi koji obavljaju oksidativnu dekarboksilaciju se nazivaju IAA-oksidaze (Tromas i Perrot-Rechenmann 2010).

Transkripcija gena iz familije *Auxin/Indoleacetic Acid* (*Aux/IAA*) igra ključnu ulogu u regulaciji odgovora biljaka na auksine (Salehin i sar. 2015, Leyser 2018). Kada su auksini prisutni u biljci, oni se vezuju za specifične receptore u nukleusu, formirajući kompleks sa transkripcionim represorima Aux/IAA. Ovo vezivanje izaziva konformacione promene koje dovode do razgradnje proteina Aux/IAA putem ubikvitin-proteazomskog puta (**Slika 4.**). Degradacija Aux/IAA za posledicu ima aktivaciju TF ARF (engl. „*Auxin Response Factors*“), koji se vezuju za sekvence auksinskih responsivnih elemenata (engl. „*AuxRe*“) u promotorskim regionima ciljnih gena (Bargmann i Birnbaum 2009, Li i sar. 2016) (**Slika 4.**). Proteini ARF, zauzvrat, aktiviraju ili inhibiraju ekspresiju nizvodnih ciljnih gena, koji su uključeni u različite ćelijske procese. Aktivacija ili represija ciljnih gena dovodi do različitih odgovora, uključujući izduživanje ćelija, razvoj korenova i izdanaka, diferencijaciju vaskularnih tkiva, tropičke odgovore i druge procese indukovane auksinima (Luo i Di 2023). Kada je koncentracija auksina niska, Aux/IAA se uz pomoć drugog transkripcionog represora, TPL (engl. „*Topless*“), vezuje za ARF proteine i na taj način ih inaktivira (Bargmann i Birnbaum 2009, Leyser 2018) (**Slika 4.**).



Slika 4. Regulacija koncentracije auksina u ćeliji pomoću proteina Aux/IAA i ARF. *AuxRe* - auksinski responsivni elementi; ARF – transkripcioni faktor; IAA - Aux/IAA transkripcioni represori. Preuzeto i modifikovano prema Bargmann i Birnbaum 2009.

1.3. Efekat auksina na indukciju somatske embriogeneze

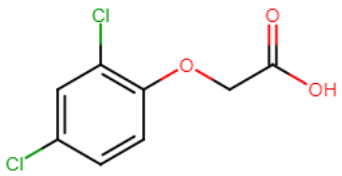
Značaj biljnih hormona i RRB u svim fazama SE poznat je više decenija. Iako postoji veliki broj protokola za indukciju SE koji su prilagođeni različitim vrstama i genotipovima biljaka, najvažniji faktor za indukciju SE i formiranje embriona je pravilno doziranje RRB u hranljivoj podlozi (Gaj 2004). Većina protokola za indukciju SE se oslanja na upotrebu auksina, samostalno ili u kombinaciji sa citokininima (Gaj 2004), a u pojedinim slučajevima i abscisinska kiselina (ABA), giberelini (GA) ili etilen mogu da doprinesu pojačanom embriogenom odgovoru (Nishiwaki i sar. 2000). Auksini pokreću molekularne mehanizme neophodne, kako za

indukciju SE, tako i za formiranje novih **se**. Egzogena primena auksina dovodi do disbalansa nivoa endogenih auksina, čime utiče na njihov metabolizam unutar ćelije. Iako su egzogeno dodati auksini uglavnom neophodni za formiranje embriogenih ćelija, za formiranje **se** je najčešće potrebno njihovo uklanjanje iz hranljive podloge čime se pospešuje sinteza endogenih auksina. Kod mnogih biljnih vrsta je pokazano da veća koncentracija endogenih auksina dovodi do pojačanog embriogenog odgovora, tako što utiče na ekspresiju nekoliko klasa gena, od kojih su neke povezane sa stresom (Jiménez i sar. 2013). Drugi aspekt homeostaze auksina koji utiče na SE je njihov polarni transport, koji ima važnu ulogu u uspostavljanju apikalno-bazalne osovine i bilateralne simetrije kako zigotskih, tako i **se** dikotila i monokotila (Chen i sar. 2010).

1.3.1. Efekat egzogene primene auksina

Egzogena primena auksina u kulturi *in vitro* dovodi do disbalansa nivoa endogenih auksina, modifikujući metabolizam IAA unutar ćelije. Analiza genske ekspresije kod pamuka (*Gossypium hirsutum*) je pokazala da se čak 86 gena, povezanih sa sintezom, transportom, metabolizmom i signalnim putevima auksina, diferencijalno eksprimira u početnim fazama dediferencijacije somatskih ćelija (Yang i sar. 2012). Neki od transkripata ovih gena, uključujući *PIN1*, *Aux1/LAX*, *AUX/IAA*, *ARF*, *YUC*, *GH3*, *SAUR* (engl. „*Small Auxin Up RNA*"), su zastupljeni u velikoj količini, uglavnom tokom formiranja embriogenog kalusa, dok im ekspresija znatno opada tokom formiranja **se** (Yang i sar. 2012).

U sintetičke auksine koji mogu indukovati SE spadaju α-naftil sirćetna kiselina (NAA), 4-amino-3,5,6-trihloropiridin-2-karboksilna kiselina (pikloram), 2-metoksi-3,6-dihlorbenzoeva kiselina (dikamba), a najefikasnija je 2,4-dihlorfenoksi sirćetna kiselina, 2,4-D (**Slika 5.**), koja se zbog toga najčešće i koristi u kulturi *in vitro*. Prema Wójcik i sar. (2020), 2,4-D je korišćena samostalno ili u kombinaciji sa drugim hormonima u više od 65% protokola za indukciju SE. Ona deluje direktno, kao auksin, ili indirektno, tako što dovodi do prolaznog povećanja koncentracije endogene IAA (Nic-Can i Loyola-Vargas 2016). Eksplantati sa većim sadržajem endogene IAA su podložniji indukciji SE pomoću 2,4-D (Jiménez 2005) ili ne zahtevaju primenu sintetičkih auksina, već se SE dešava spontano (Nishiwaki i sar. 2000).



Slika 5. Hemijska struktura molekula 2,4-dihlorfenoksi sirćetne kiseline (2,4-D).

Pored toga što je 2,4-D biljni regulator rastenja, ona je istovremeno i herbicid i ove kontrastne osobine su najverovatnije razlog njene efikasnosti u indukciji embriogenog odgovora (Nishiwaki i sar. 2000). Osim toga, tokom SE se sintetišu brojni proteini odbrane (engl. „*defense proteins*"), što dodatno potvrđuje da je SE adaptivni proces biljnih ćelija na stres (Fehér 2015). Doprinos 2,4-D pojačanom embriogenom odgovoru se ogleda i u nedostatku njene degradacije, jer je, za razliku od IAA, manje podložna razgradnji pomoću IAA-oksidaza. Posledica ovakvog načina delovanja 2,4-D je reprogramiranje transkripcije gena, koje dovodi do promene obrasca razvića, naročito u biljnim vrstama sa većim sadržajem endogene IAA.

Somatske ćelije odgovaraju na 2,4-D reaktivacijom deobe i dediferencijacijom usled narušenog balansa i polarnog transporta endogenih auksina. Ubrzana proliferacija ćelija je obezbeđena povišenom ekspresijom glavnih regulatora ćelijskog ciklusa, kompleksa ciklina i kinaza zavisnih od ciklina (engl. „*Cyclin-dependent kinases*", CDK). Ovi kompleksi se aktiviraju nakon što se fosforilišu ili defosforilišu, a svoju ulogu ostvaruju tako što fosforilišu različite

supstrate neophodne za pravilan tok ćelijskog ciklusa, kao što su proteini koji utiču na replikaciju i transkripciju (Moreno i Nurse 1990). Funkciju kinaze ima protein od 34 kilodaltona (kDa), p34, koji funkcioniše tokom prelaza ćelije kroz kontrolna mesta ćelijskog ciklusa G1→S i G2→M. Ciklini i CDK su kodirani istim *CDC* genima, (eng. „*Cell Division Cycle*"). U mikrokalusima iz suspenzije ćelija *Medicago sativa* nakon tretmana sa 2,4-D dolazi do značajno povišene ekspresije gena *CDC2* koji kodira za p34, naročito tokom rane SE (Hirt i sar. 1991). Tokom dediferencijacije dolazi i do promena na epigenetičkom nivou. Pokazano je da 2,4-D inhibira faktor diferencijacije PRZ1 („*Proporz1*"), koji ima ulogu da održava diferencirano stanje u ćelijama, tako što modifikuje hromatin i inhibira ekspresiju nepotrebnih gena u diferenciranom stanju (Feher 2015).

1.4. Efekat regulatora rastenja na ekspresiju gena za transkripcione faktore povezane sa SE

Reprogramiranje somatskih ćelija u smeru embriogenog razvića zahteva značajne modifikacije transkriptoma i podrazumeva aktivaciju ili inhibiciju ekspresije brojnih gena, što ukazuje na značajnu ulogu TF u regulaciji genske ekspresije tokom SE. Među genima koji se aktiviraju tokom SE, dominantni su geni koji kodiraju TF povezane sa odgovorima na hormone, što potvrđuje osnovnu ulogu RRB u kontroli SE (Jiménez 2005). Na primer, 43% gena za TF koji se aktiviraju tokom SE u *A. thaliana*, povezani su sa hormonima (Gliwicka i sar. 2013). Pored brojnih TF koji regulišu metabolizam i signalizaciju auksina, u *A. thaliana* i drugim biljnim vrstama se aktiviraju i TF povezani sa citokininima, etilenom, ABA, GR, jasmonskom kiselinom (JA) i brasinosteroidima (BR) (Chakrabarty i sar. 2003, Singla i sar. 2007, Imin i sar. 2008, Wiśniewska i sar. 2012, Gliwicka i sar. 2013, Wickramasuriya i Dunwell 2015).

Ektopična ekspresija nekoliko TF koji su inače uključeni u razviće semena može da indukuje SE. Ovi TF uključuju LEC1 (engl. „*Leafy Cotyledon 1*"), LEC2 (engl. „*Leafy Cotyledon 2*"), FUS3 (engl. „*Fusca 3*") i ABI3 (engl. „*ABI Gene Family Member 3*") iz grupe LAFL (Braybrook i Harada 2008, Liu i sar. 2018), agamusu sličan protein 15 (engl. „*Agamous-Like 15*", AGL15) (Harding i sar. 2003, Thakare i sar. 2008), WUS (engl. „*Wuschel*") (Jha i sar. 2020), BBM (engl. „*Baby Boom*") (Boutilier i sar. 2002, Jha i Kumar 2018) i WIND1 (engl. „*Wound-induced differentiation 1*") (Iwase i sar. 2011). Biosinteza, signalni putevi i metabolizam auksina su u velikoj meri direktno ili indirektno povezani sa aktivnošću ovih TF, a ovakva interakcija ima značajnu ulogu tokom indukcije SE (Stone i sar. 2008, Tian i sar. 2020).

Geni *LEC* kodiraju TF koji se mogu svrstati u dve klase. LEC2, FUS3 i ABI3 spadaju u TF sa B3 domenom, dok LEC1 spada u NF-YB klasu TF (Carbonero i sar. 2017). Ovi TF deluju kako u ranoj fazi embriogeneze, tako i u kasnijim fazama razvića embriona i semena, uključujući formiranje kotiledona, dormanciju i desikaciju (Junker i sar. 2012). LEC deluju tokom SE tako što mogu aktivirati gene koji su neophodni za dediferencijaciju ćelija i formiranje **se** (Zhu i sar. 2014). Pokazano je da *LEC* geni modifikuju biosintezu i metabolizam auksina što može dovesti do indukcije SE. *LEC1* i *LEC2* pozitivno regulišu ekspresiju nekih od gena koji kodiraju najvažnije enzime uključene u biosintezu auksina, kao što su *TAR1* i *YUC* geni (Junker i sar. 2012, Wójcikowska i sar. 2013, Horstman i sar. 2017). Kao rezultat aktivacije IPA puta za biosintezu auksina, dolazi do značajnog povećanja koncentracije IAA u eksplantatima koji prolaze kroz embriogenu tranziciju (Wójcikowska i sar., 2013), što ima za posledicu aktivaciju gena koji dovode do formiranja **se**. Dodatno, u promotorskom regionu *LEC2* su pronađene *AuxRe* sekvence, što ukazuje da ARF proteini regulišu njegovu ekspresiju. Pored toga što regulišu metabolizam auksina, *LEC* posreduju i u transdukciji signala auksina. U klijancima *A. thaliana*, *LEC1* i *LEC2* aktiviraju neke od važnih gena auksinskog puta, kao što su članovi *Aux/IAA* familije gena (*IAAs*) (Braybrook i Harada 2008, Stone i sar. 2008). *LEC2* je uključen i u polarni transport

auksina, pa je tako u transgenim biljkama duvana sa prekomernom ekspresijom *LEC2* primećena povišena ekspresija *PIN1* i *PIN2* (Guo i sar. 2013).

LEC mogu međusobno stupati u interakciju kako bi formirali proteinske komplekse koji aktiviraju gene (Baud i sar. 2016) koji imaju direktnu ulogu u regulaciji SE (Wójcik i sar. 2020). Jedan od najvažnijih gena u ovom procesu je *AGL15*, koji učestvuje u signalnim putevima auksina i na taj način pozitivno utiče na indukciju SE (Zheng i sar. 2016). *AGL15* kodira za TF sa MADS domenom koji se eksprimira i akumulira tokom ranog razvića semena, uglavnom unutar embriona (Heck i sar. 1995, Perry i sar. 1996). *LEC2* i *AGL15* međusobno regulišu svoju ekspresiju putem pozitivne povratne sprege (Wójcik i sar. 2020), a oba gena direktno aktiviraju transkripciju Aux/IAA transkripcionog represora IAA30, što smanjuje odgovor i akumulaciju auksina (Sato i Yamamoto 2008). Pored toga, *AGL15* može uticati na ekspresiju više gena povezanih sa drugim RRB, uključujući metabolizam etilena, GA i BR (Wang i sar. 2004). Osim što smanjuje odgovor gena povezanih sa auksinima, *AGL15* smanjuje i odgovor gena povezanih sa GA i BR, dok povećava odgovor i dovodi do akumulacije etilena (Joshi i sar. 2022).

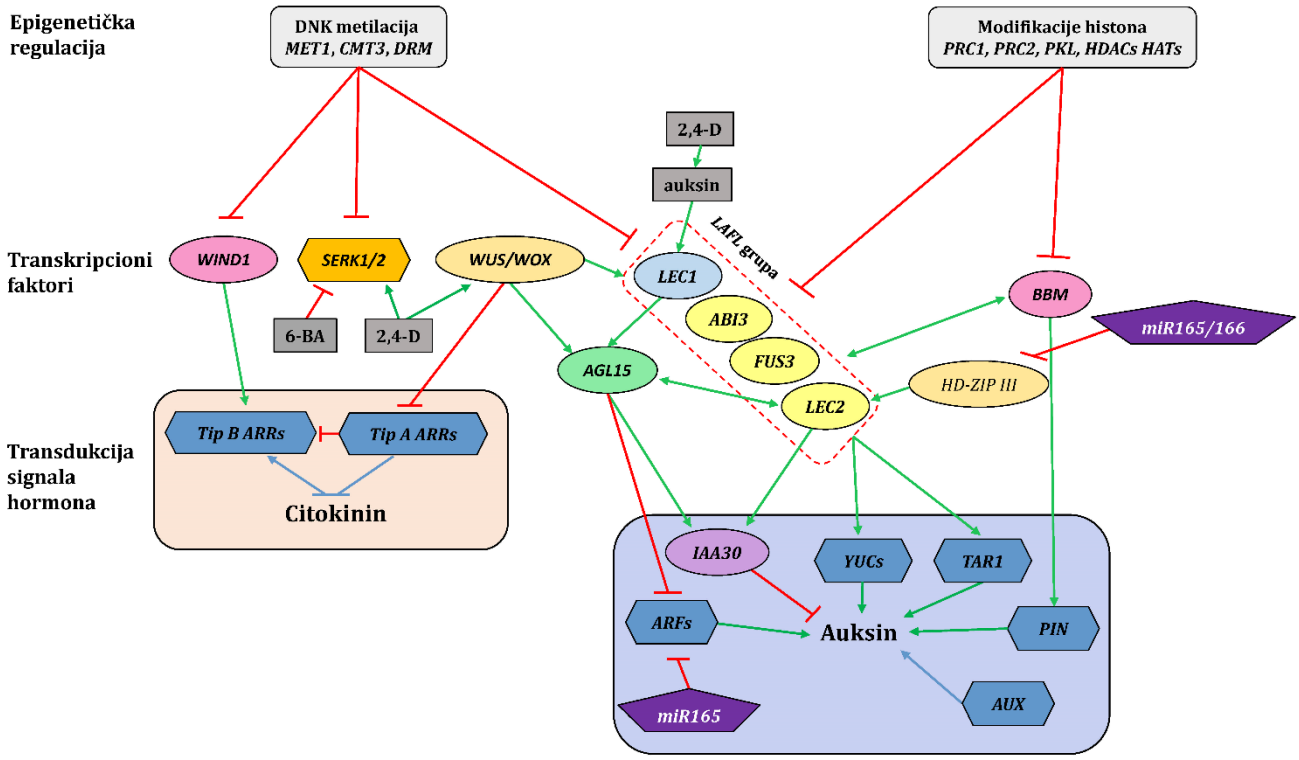
Pored LEC1, AGL15 formira složenu mrežu interakcija sa nekoliko drugih TF koji indukuju SE, uključujući BBM i WUS (Tian i sar. 2020). Pokazano je da BBM stimuliše biosintezu auksina ili povećava osetljivost ćelija na ovaj hormon (Boutilier i sar. 2002). Osim što pozitivno utiče na ekspresiju gena povezanih sa biosintezom auksina (*YUCs*, *TAR1*), BBM takođe direktno reguliše gene koji su uključeni u transport auksina (*PINs*) i signalne puteve auksina (*ARFs*, *IAAs*) (Horstman i sar. 2017). Pored toga, BBM putem pozitivne povratne sprege povećava ekspresiju *LEC* gena, što ukazuje na povezanost puteva BBM i LEC u indukciji SE (Horstman i sar. 2017). WUS je TF sa homodomenom koji je uključen u uspostavljanje organizacionog centra apikalnog meristema izdanka i određivanje sudbine meristemskih ćelija (Laux i sar. 1996). Osim toga, WUS ima značajnu ulogu u SE, učestvujući, kako u indukciji SE, podsticanjem prelaska somatskih ćelija u embrione, tako i u formiranju **se** (Zuo i sar. 2002). Tokom SE, dolazi do povećane ekspresije *WUS* gena koji dalje indukuje transkripciju *LEC1*, *LEC2* i *AGL15* gena (Jha i sar. 2020) (**Slika 6**.).

Pokazano je da se WIND1, TF iz AP2/ERF familije koji pozitivno reguliše ćelijsku dediferencijaciju kod *A. thaliana*, indukuje nakon povrede (Iwase i sar. 2011). Na taj način, on nije direktno uključen u formiranje **se**, već ima ulogu u indukciji kalusa tokom ISE. Slično kao i WUS, WIND1 deluje uzvodno od LEC2 (Iwase i sar. 2015). Međutim, u poređenju sa LAFL proteinima, WUS i WIND1 indukuju SE preko različitih puteva hormona (**Slika 6**.) i uglavnom su uključeni u specifične odgovore citokinina, umesto u biosintezi i signalnoj transdukciji auksina (Horstman i sar. 2017). WUS i WIND1 negativno i pozitivno regulišu gene *tip-A ARR* (engl. „*Type-A Arabidopsis Response Regulator*“) i *tip-B ARR* (engl. „*Type-B ARR*“) koji su odgovorni za dejstvo citokinina. *WUS* inhibira negativne regulatore citokininskog odgovora, *tip-A ARR* gene, dok *WIND1* stimuliše ekspresiju pozitivnih regulatora citokininskog odgovora, *tip-B ARR* gene (Leibfried i sar. 2005, Iwase i sar. 2011) (**Slika 6**.).

Prvi otkriveni gen koji ima ulogu u sticanju embriogenog potencijala je gen koji kodira za receptornu kinazu, *Somatic Embryogenesis Receptor Kinase* (*SERK*), koji je izolovan od strane Schmidt i sar. (1997). Pokazano je da se ovaj gen u šargarepi eksprimira u embriogenim kulturama u prisustvu 2,4-D, ali da mu se ekspresija naglo smanjuje nakon globularnog stadijuma embriona. Dodatno, ovaj gen se eksprimira i u zigotskim embrionima do globularnog stadijuma, ali ne i u cvetovima ili drugim tkivima. Nakon ovih istraživanja, homolozi ovih gena su pronađeni i u drugim biljnim vrstama, uključujući *A. thaliana* (Hecht i sar. 2001), pirinač (Hu i sar. 2005), pšenicu (Singla i sar. 2008), kukuruz (Zhang i sar. 2011) i druge vrste. U tim vrstama je takođe primećena viša ekspresija *SERK* gena u embriogenom kalusu i embrionima u nastajanju u poređenju sa neembriogenim kalusom (Gulzar i sar. 2020). Primena 2,4-D

pojačava ekspresiju *SERK* gena što podstiče SE, dok citokinin 6-benziladenin (6-BA) smanjuje njihovu ekspresiju, time inhibirajući SE (Zhang i sar. 2011, Méndez-Hernández i sar. 2019) (**Slika 6.**).

Pored gena koji kodiraju za proteine, i neke od klasa nekodirajućih RNK (*non-coding RNA*, ncRNK) mogu da utiču na indukciju SE. Pokazano je da mikroRNK (miRNK) *miR*165/166 i *miR*-160 mogu doprineti indukciji SE povezane sa auksinom tako što deluju na gene iz *HD-ZIP III* familije, kao što su *PHB/PHV* (engl. *„Phabulosa/Phavoluta"*), koji pozitivno regulišu ekspresiju *LEC2* i *ARF* gena, redom (Wójcik i sar. 2017, Jin i sar. 2020) (**Slika 6.**).



Slika 6. Odabrane interakcije između TF koji učestvuju u SE i u kontroli transdukcije signala RRB. Različito obojena područja sa imenima TF označavaju različite familije TF: žuti - B3 domen; plavi - NF-YB; roze - APETALA2 (AP2) ili AP2/ERF; mint zeleni - MADS; lavanda - AUX/IAA domen; svetlo narandžasti - homodomen. Sivi okviri označavaju odgovore na hormone ili druge stimuluse. Ljubičasti šestougao - miRNK; narandžasti šestougao - *SERK1/2*. Radi preglednosti na slici, izostavljena je strelica koja ukazuje na pozitivnu povratnu spregu između *BBM* i *LEC* gena. Preuzeto i modifikovano prema Long i sar. 2022.

1.5. Epigenetička regulacija somatske embriogeneze

Epigenetičke modifikacije imaju značajnu ulogu u različitim fazama razvića i adaptaciji biljaka na različite tipove stresa (Joshi i sar. 2022.). Struktura hromatina može biti dostupna ili zaključana posredstvom različitih epigenetičkih mehanizama kao što su metilacija DNK, modifikacije histona i remodelovanje hromatina (Joshi i sar. 2022.). Epigenetička regulacija je dinamična i konstantno se menja u odgovoru na potrebe ćelija i spoljašnje uticaje (Klemm i sar. 2019). Na taj način, epigenetički mehanizmi mogu reprogramirati sudbinu ćelija ili stabilizovati identitet tkiva održavajući identitet ćelija (Inácio i sar. 2018, Hajheidari i sar. 2019). Izazvane epigenetičke promene mogu biti prolazne ili stabilne tokom određenog vremenskog perioda i mogu se preneti na potomstvo (Liu i He 2020). Ova regulacija je važna za održavanje identiteta somatskih ćelija putem suzbijanja ekspresije gena specifičnih za embriogenu putanju razvića

(**Slika 6.**). Važno je istaći da u *in vitro* uslovima mogu nastati varijacije koje aktiviraju epigenetičke mehanizme i tako indukciju SE (De-la-Peña i sar. 2015, Kumar i Van Staden 2017).

Metilacija DNK je važna za razviće **se** (Nic-Can i sar. 2013, Yakovlev i sar. 2016, Méndez-Hernández i sar. 2019). Uopšteno, više stope metilacije DNK su zapažene u neembriogenim kulturama *P. nigra* (Noceda i sar. 2009), *Pinus radiata* (Bravo i sar. 2017), *Rosa* x *hybrid* (Xu i sar. 2004) i *Eleutherococcus senticosus* (Chakrabarty i sar. 2003), dok su niže stope DNK metilacije prisutne u embriogenim kulturama nekoliko biljnih vrsta. Kod *Quercus alba*, DNK prolazi kroz demetilaciju tokom indukcije SE (Corredoira i sar. 2017), kao i tokom generisanja proembriogene mase (PEM), ali metilacija postepeno raste tokom formiranja embriona (LoSchiavo i sar. 1989). Slični rezultati su zabeleženi tokom SE kod *C. canephora* (Nic-Can i sar. 2013), gde je u PEM uočen niži stepen metilacije DNK, dok je sazrevanje embriona praćeno postepenim povećanjem nivoa metilacije. Niži nivoi metilacije DNK uočeni tokom SE su povezani sa aktivnošću DNK metiltransferaze, MET1, hromometilaze 3 (CMT3) i metiltransferaze 2 (DRM2) (Karim i sar. 2018, Wójcikowska i sar. 2020) (**Slika 6.**).

Pored DNK metilacije, i histonske modifikacije kao što su metilacija, acetilacija i ubikvitinacija mogu da regulišu SE. Proteini Polikomb represivnog kompleksa (engl. „*Polycomb Repressive Complex 1;2*“, PRC1 i PRC2), su neophodni za uspostavljanje i održavanje stabilne epigenetičke supresije putem metilacije histona u odgovoru na spoljašnje signale i signale razvića (Mozgova i Hennig 2015) (**Slika 6.**). Nedavno istraživanje je pokazalo da PRC1 i PRC2 inhibiraju ekspresiju gena specifičnih za embrione, uključujući *LEC*, *AGL15*, *WOX5*, *BBM* i *PIN1* (Duarte-Aké i sar. 2019). Još jedan epigenetički faktor koji sprečava somatske ćelije da ispolje osobine embriona je PKL (engl. „*Pickle*“), koji takođe inhibira ekspresiju gena povezanih sa embriogenezom kao što je *LEC* (Dean Rider Jr i sar. 2003) (**Slika 6.**). Pored metilacije, i acetilacija histona koja je kontrolisana od strane enzima histon acetiltranferaza (HATs) i histon deacetilaza (HDACs), ima važnu ulogu u utišavanju gena koji su uključeni u proces SE (Tanaka i sar. 2008) (**Slika 6.**).

1.6. Upotreba funkcionalne genomike u cilju identifikacije novih biljnih gena

Sekvenciranje genoma model organizma *Arabidopsis thaliana* bilo je od neprocenjive važnosti za naučnu zajednicu koja se bavi biljkama. Za postizanje prvobitnog nacrta referentnog genoma *A. thaliana* bilo je potrebno međunarodno zalaganje koje je trajalo gotovo jednu deceniju, uz ulaganje od oko 100 miliona dolara (Initiative 2000). Uspeh ovog projekta, koji je postignut uz primenu Sanger tehnologije sekvenciranja (koja se smatra tehnologijom sekvenciranja prve generacije), bio je glavni pokretač razvoja biljne genomike (Mardis 2017). Napredak tehnologija sekvenciranja druge (*Next-Generation Sequencing*, *NGS*) i treće generacije (*Third-Generation Sequencing*, *TGS*) značajno je olakšao sekvenciranje kompletnih genoma, smanjio troškove i pojednostavio proces sastavljanja genoma. Troškovi sekvenciranja su sada dostupni većini laboratorija, što je dovelo do eksplozije sekvenciranja biljaka, kako model-vrsta, tako i onih koje to nisu (Jung i sar. 2019).

Transkriptomika, proteomika i metabolomika su naučne discipline koje u širem smislu spadaju pod oblast genomike. Transkriptomika podrazumeva proučavanje transkriptoma, odnosno kompletnog skupa RNK molekula (transkripata) koji se eksprimiraju u ćelijama, tkivu ili organizmu u datom trenutku (Lowe i sar. 2017). To su pretežno iRNK, ali mogu biti ribozomalna RNK (rRNK), transportna RNK (tRNK) i razne ncRNK. Sa dolaskom pristupačnih *NGS* platformi (Slatko i sar. 2018), sekvenciranje RNK visoke propusnosti (engl. „*High-throughput RNA sequencing*“ ili *RNA-seq*) je postalo metoda izbora za proučavanje transkriptoma (Mantione i sar. 2014, Stark i sar. 2019). Proteomika ima za cilj sveobuhvatnu

analizu proteina, dok se u metabolomici istražuju metaboliti prisutni u tkivu, ćeliji ili unutar određenih delova ćelije (Barh i sar. 2015). Koncept „omika“ predstavlja napredan način istraživanja koji integriše raznovrsne tipove podataka o genomima, transkriptomima, proteomima i metabolomima u jedinstveni skup podataka. Ovakav skup podataka se može koristiti za identifikaciju do sada nepoznatih gena i njihovih regulatornih mreža (Barh i sar. 2015). Rastući broj sekvenciranih genoma biljaka otvara velike mogućnosti za proučavanje bioloških procesa povezanih s fiziologijom, rastenjem i razvićem, kao i tolerancijom na biotički i abiotički stres koristeći sveobuhvatni pristup (Barh i sar. 2015).

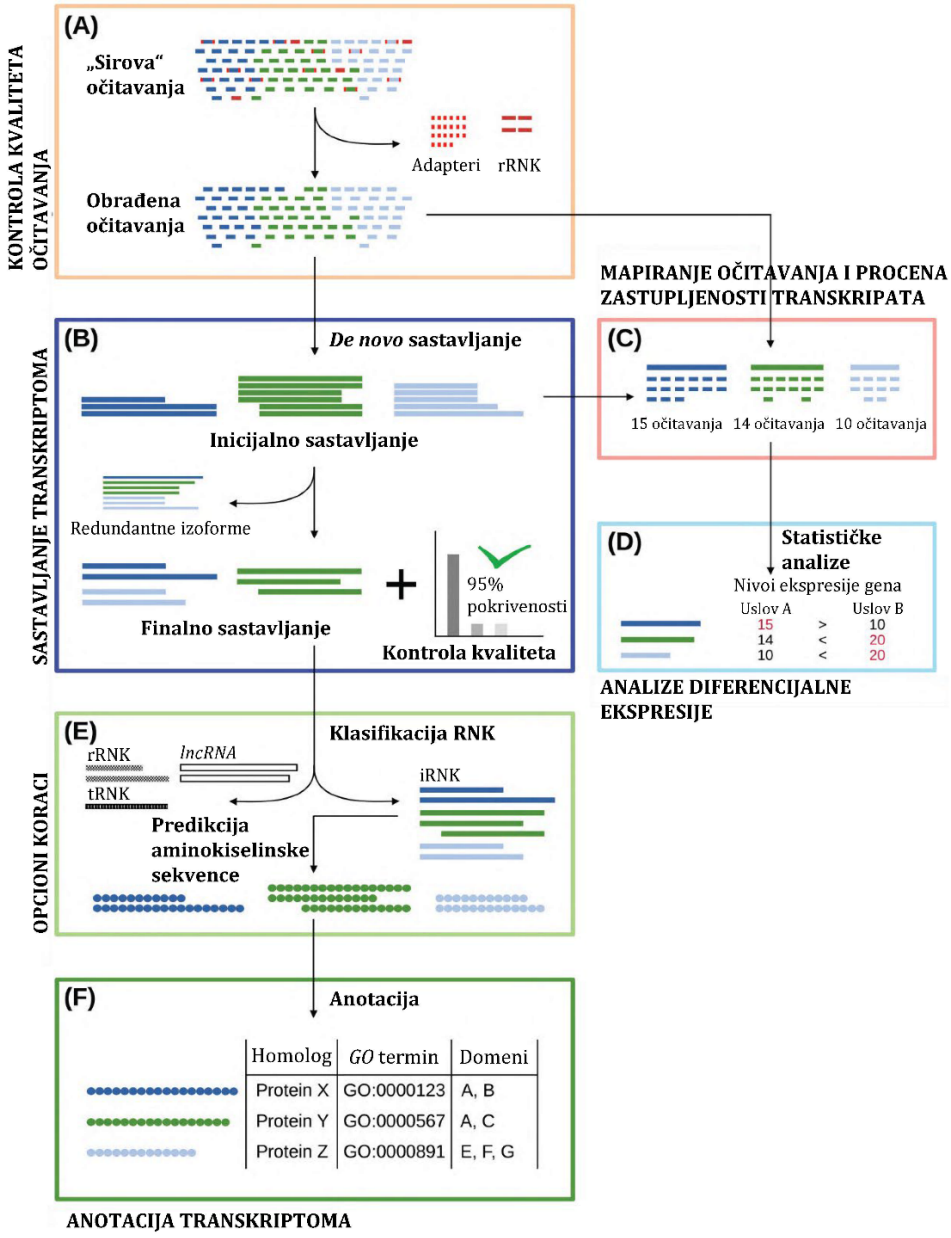
Sastavljan genom je sekvenca koja se dobija kada se svi hromozomi željene vrste fragmentišu na veliki broj kraćih i dužih DNK sekvenci, zatim sekvenciraju i nakon toga kompjuterski spoje kako bi se rekonstruisale originalne, netaknute sekvence hromozoma (Jung i sar. 2019). U situacijama kada već postoji sekvencirani genom bliske vrste, deo tih podataka se može iskoristiti za mapiranje, odnosno identifikaciju i lociranje očitavanja genoma ciljne vrste. Ovaj pristup, koji koristi referentni genom, se oslanja na sličnosti između ciljne i referentne vrste kako bi se dobile dodatne informacije i povećao kvalitet sastavljanja genoma (Pop i sar. 2004, Schneeberger i sar. 2011, Bao i sar. 2014). Nasuprot tome, *de novo* sastavljanje genoma se primenjuje kada nema prethodnih informacija o dužini, rasporedu ili sastavu originalne DNK sekvence. Cilj ovog procesa je stvaranje izuzetno precizne, kontinuirane (neprekidni niz preklapajućih DNK) konsenzusne sekvence koja predstavlja haploidnu verziju genoma ciljne vrste (po jedna za svaki roditeljski haplotip) (Jung i sar. 2019).

Najosnovniji pristup za *de novo* sastavljanje genoma sastoji se od tri koraka. Najpre je neophodna izolacija visokomolekulske DNK bez kontaminanata. Drugi korak podrazumeva pripremu DNK biblioteka pomoću kompleta koje obezbeđuju proizvođači, nakon čega se ove biblioteke sekvenciraju na odgovarajućoj platformi. Treći korak podrazumeva sastavljanje genoma, što je zahtevan računarski zadatak u kojem se preklapajuće sekvence koriste za kreiranje kontinuiranih sekvenci dužine hromozoma (Jung i sar. 2019). Važno je napomenuti da same *de novo* sastavljene sekvence nemaju samostalno informativnu vrednost. Kako bi se razjasnio njihov biološki značaj, moraju im biti dodeljeni lako razumljivi identifikatori i opisane njihove funkcionalne i evolucione karakteristike u procesu koji se naziva anotacija. Glavni cilj ovog postupka je razjašnjavanje funkcija ovih sekvenci, što se često naziva funkcionalna anotacija. Kroz ovaj proces, istraživači stiču uvid u uloge i aktivnosti identifikovanih sekvenci, što doprinosi boljem razumevanju njihovog biološkog značaja unutar proučavanog organizma (Raghavan i sar. 2022).

Analogno procesu sastavljanja genoma, postoje dva pristupa za sastavljanje transkriptoma: vođeno referencom i *de novo* sastavljanje. Sastavljanje vođeno referencom podrazumeva postojanje poznatog genoma organizma ili bliskih vrsta kao ulazne podatke. Dobijena očitavanja sekvenci se potom mapiraju na taj referentni genom kako bi se identifikovalo iz kojih gena potiču i rekonstruisali pripadajući transkripti (Martin i Wang 2011). Sa druge strane, *de novo* sastavljanje transkriptoma se odvija „bez referenci“. U ovom pristupu, nema prethodnih informacija koje bi vodile rekonstrukciju, već se sastavljanje bazira samo na informacijama sadržanim u očitavanjima. U ovom procesu, RNK (uglavnom iRNK) se izoluje i reverzno transkribuje u komplementarnu DNK (cDNK). Zatim se cDNK fragmentiše i amplifikuje metodom lančane reakcije polimeraze (engl. „*Polymerase chain reaction*“, PCR) kako bi se dobila *RNA-seq* cDNK biblioteka, koja se potom sekvencira na odgovarajućoj platformi (Kukurba i Montgomery 2015, Hrdlickova i sar. 2017). Rezultat sekvenciranja su milioni kratkih očitavanja, koja se zatim moraju sastaviti u originalne sekvence iz kojih potiču, odnosno obavlja se sastavljanje transkriptoma (Martin i Wang 2011).

Postupci nakon sekvenciranja RNK su sažeto prikazani na **Slici 7.** *RNA-seq* podaci prvo prolaze kroz kontrolu kvaliteta kako bi se uklonili neželjeni delovi poput očitavanja koja potiču

od rRNK i adapterskih sekvenci (kratki oligonukleotidi ligirani na oba kraja cDNK) (**Slika 7 A**). Zatim se podaci *de novo* sastavljaju kako bi se dobio kompletni transkriptom, a nakon toga se ponovo proveravaju kako bi se minimizirale greške u sastavljanju (**Slika 7 B**). Dalje, vrši se poravnanje očitavanja i procenjuju se nivoi ekspresije gena/transkripata, uz procenu zastupljenosti transkripata (**Slika 7 C**). Sekvence proteina, koje su korisne za anotaciju, mogu se dobiti prevođenjem sekvenci transkripata u aminokiseline (ak) (**Slika 7 E**). Na kraju, nukleotidne (i/ili prevedene proteinske) sekvence se anotiraju kako bi im se dodelili čitljivi identifikatori i objasnila njihova biološka uloga (**Slika 7 F**).



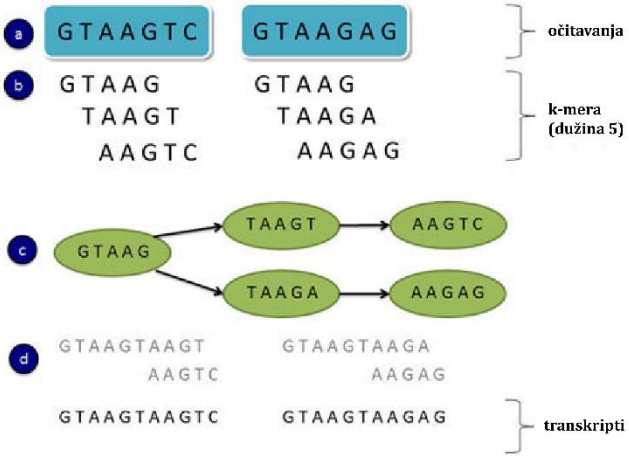
Slika 7. Postupak sastavljanja i anotacije transkriptoma. (A) Kontrola kvaliteta „sirovih" očitavanja filtriranjem očitavanja sa greškom i artefakata sekvenciranja; (B) Sastavljanje sekvenci uključujući grupisanje u grupe izoformi i uklanjanje redundantnih sekvenci; (C) Mapiranje „sirovih" očitavanja na sastavljene sekvence radi kontrole kvaliteta sastavljanja ili analize diferencijalne ekspresije; (D) Primena statističkih testova za identifikaciju promena u nivoima ekspresije; (E) Klasifikacija sekvenci prema tipu RNK i prevođenje u sekvence proteina pre anotacije; (F) Anotacija sekvenci na osnovu sličnosti sekvenci, identifikacija karakteristika sekvenci (kao što su funkcionalni domeni) i anotacija *Gene Ontology* (*GO*) termina. Preuzeto i modifikovano prema Raghavan i sar. (2022).

RNA-seq ima širok spektar primena, a najčešće se koristi za funkcionalnu anotaciju transkriptoma, tj. kao katalog gena i proteina određenog organizma, kao i za analizu promena u ekspresiji gena u odgovoru na fiziološke ili uslove sredine (Mantione i sar. 2014, Stark i sar. 2019). Upoređivanjem ekspresije gena, moguće je dobiti uvid u aktivnost gena u različitim okolnostima, odnosno identifikovati diferencijalno eksprimirane gene (DEG) (Raghavan i sar. 2022). Ovo se postiže sekvenciranjem RNK iz nezavisnih uzoraka izloženih eksperimentalnim i kontrolnim uslovima. Za analizu diferencijalne ekspresije, u *de novo* sastavljenim transkriptomima, očitavanja iz svih uslova i ponavljanja se grupišu zajedno kako bi se formirao jedinstveni „referentni" transkriptom, prema kojem se očitavanja mapiraju i kvantifikuju kako bi se identifikovali geni čija se ekspresija razlikuje (Raghavan i sar. 2022). Prediktovana ekspresija se potom može potvrditi u eksperimentalnim uslovima nekom osetljivom metodom za kvantifikaciju ekspresije, kao što je kvantitativni qPCR u realnom vremenu (engl. „*Real-Time quantitative PCR*" ili qPCR).

Različite platforme za sekvenciranje zahtevaju različite ulazne parametre (DNK ili RNK, način rada i pripremu uzoraka), računarsku opremljenost i troškove, pri čemu svaka metoda za sastavljanje koristi više softverskih paketa i tehnika za obradu podataka. Ova raznovrsnost omogućava istraživačima da odaberu najprikladniju platformu za svoje specifične potrebe i ciljeve. *NGS* tehnologije kao što su *Illumina* (*Illumina*, San Dijego, SAD), *454* (*Roche*, Bazel, Švajcarska), *SOLiD* (*Life Technologies*, Karlsbad, SAD) i *Ion Torrent* (*Thermo Fisher Scientific*, Voltam, SAD), predstavljaju visokoprocesivne, brze, ekonomične i izuzetno precizne uređaje za sekvenciranje, koji proizvode kratka očitavanja dužine od 75 do 700 baznih parova (bp). U većini *RNA-seq* analiza koriste se kratka očitavanja (Kukurba i Montgomery 2015, Salzberg 2019, Stark i sar. 2019). Većina velikih biljnih genoma sadrži veliki broj ponavljajućih i dupliranih sekvenci zbog duplikacija čitavih genoma, hromozoma, ili tandemskih ponovaka, kao što su aktivnosti transpozona (Pellicer i sar. 2018, Wang i sar. 2018). Bioinformatičke metode za sastavljanje genoma zasnovane na kratkim očitavanjima (75–700 bp) mogu imati teškoće pri razrešavanju ovih ponavljajućih regiona, što može dovesti do fragmentacije kontiga (niz preklapajućih sekvenci koje zajedno čine kontinuirani deo genoma ili regiona DNK) i stvaranja himernih sekvenci (Jung i sar. 2019). Napredne platforme treće generacije poput *PacBio* (*Pacific Biosciences*, Menlo Park, Kalifornija) i *ONT* (*Oxford Nanopore Technologies*, Oksford, Velika Britanija) generišu dugačka očitavanja od 8 kb do 40 kb, sa potpunim kontinuitetom, što je posebno korisno za sastavljanje kompleksnih biljnih genoma sa čestom pojavom poliploidije (Rhoads i Au 2015, Lin i sar. 2021). Međutim, obe tehnologije sekvenciranja dugih očitavanja nose visoke troškove po baznom paru i veće stope grešaka.

Algoritmi u *NGS* platformama najčešće umesto celih očitavanja koriste k-mere kao osnovnu jedinicu. K-mera *k* predstavlja deo sekvence dužine *k* izvedene iz određenog očitavanja (Grabherr i sar. 2011). Prvi korak u procesu sastavljanja je prikupljanje svih mogućih k-mera i očitavanja od kojih potiču te k-mere. Većina modernih softvera za sastavljanje koristi grafički pristup, gde se k-mere predstavljaju kao čvorovi u takozvanom De Brujinovom grafu/nizu (**Slika 8**.). Tokom *de novo* sastavljanja genoma formira se jedinstveni, veliki De Brujinov graf, dok *RNA-seq* generiše mnoge odvojene podgrafove koji odgovaraju grupama povezanih sekvenci, kao što su izoforme transkripata ili vrlo bliski paralozi. Najpoznatiji softver zasnovan na De Brujinovom grafu je *Trinity* (Grabherr i sar. 2011, Haas i sar. 2013). *Trinity* je robustan i jednostavan za upotrebu, sa brojnim dodatnim alatkama i velikim brojem korisnika. *PacBio* i *ONT* platforme za sekvenciranje dugih očitavanja koriste metodologiju sekvenciranja DNK u realnom vremenu. *PacBio* koristi tehniku sekvenciranja pojedinačnog molekula u realnom vremenu (engl. „*single molecule real-time*", *SMRT*) pomoću posebnih struktura (engl. „*zero-mode waveguides*", *ZMWs*) za precizno detektovanje fluorescencije i nukleotide (nt) sa fosfatnom grupom (Rhoads i Au 2015, Gordon i sar. 2016). *ONT* identifikuje bazne parove DNK

merenjem električnih struja koje se generišu dok pojedinačni lanac DNK prolazi kroz nanoporu (Jain i sar. 2017, Leggett i Clark 2017, Magi i sar. 2018).



Slika 8. Primer jednostavnog De Brujinovog grafa. (a) Sekvence očitavanja; (b) Sve k-mere dužine 5 izvedene iz očitavanja; (c) De Brujinov graf konstruisan od čvorova koji predstavljaju jedinstvene k-mere; (d) Sastavljeni transkripti putem prolaska kroz dve putanje u grafu koje predstavljaju dve moguće izoforme transkripta. Preuzeto i modifikovano prema Moreton i sar. (2015).

1.7. Nekodirajuće RNK i RNK interferencija

Nekodirajuće RNK (engl. „*Non-coding RNA*“, ncRNK) predstavljaju raznovrsnu grupu RNK molekula koji se mogu klasifikovati na različite načine u skladu sa njihovim biološkim funkcijama i dužinom (Costa 2005, Amor i sar. 2009, Liu i sar. 2012, Zhu i Wang 2012, Jin i sar. 2013, Liu i sar. 2015). Klase ncRNK kao što su rRNK, tRNK, male nukleusne RNK (engl. „*Small nuclear RNA*“, snRNK) i male nukleolusne RNK (engl. „*Small nucleolar RNA*“, snoRNK) su poznate po svojoj ulozi u sintezi proteina i obradi i modifikacijama RNK (Matera i sar. 2007). Pored RNK sa specifičnim funkcijama, druge ncRNK se uglavnom klasifikuju na osnovu njihove dužine. Dugačke nekodirajuće RNK, (engl. „*Long non-coding RNA*“, lncRNK), su transkripti duži od 200 nt (Li i Liu 2019), dok su male nekodirajuće RNK (engl. „*Small non-coding RNA*“, sncRNK) obično dužine od 20-30 nt. U sncRNK uglavnom spadaju miRNK (20–24 nt) i male interferirajuće RNK, siRNK (engl. „*small interfering RNA*“, 20–24 nt), koje često funkcionišu kao regulatori transkripcije i translacije u ćelijama (Gomes i sar. 2013, Liu i sar. 2015).

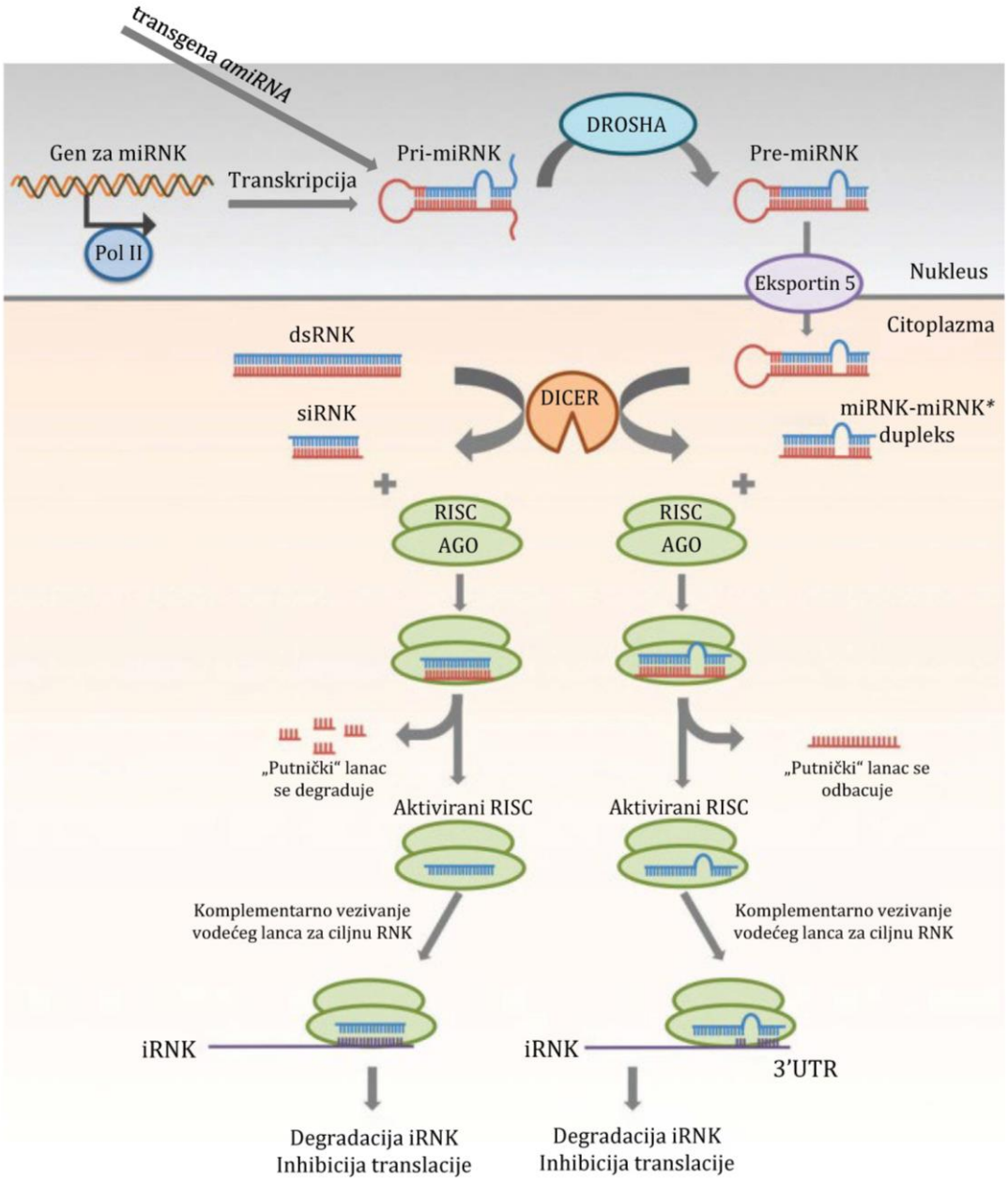
RNK interferencija (engl. „*RNA Interference*“, *RNAi*) je visoko konzervirani mehanizam regulacije gena koji označava inhibiciju genske ekspresije putem dvolančanih sncRNK čiji je jedan lanac delimično ili potpuno komplementaran ciljnoj iRNK (Jha i sar. 2015). Posledica *RNAi* je degradacija, post-transkripciono utišavanje i u nekim slučajevima transkripciono utišavanje iRNK (Jha i sar. 2015, Hung i Slotkin 2021). U prirodnom okruženju, *RNAi* služi kao mehanizam odbrane protiv aktivnosti transpozabilnih elemenata i virusa, dok kod biljaka *RNAi* takođe ima ulogu u regulaciji gena tokom razvića (Hung i Slotkin 2021). Otkriće *RNAi* je značajno promenilo paradigmu „jedan gen - jedan protein“, ukazujući da ncRNK mogu imati sveobuhvatan uticaj na ekspresiju gena (Auer i Frederick 2009).

Dve klase sncRNK, siRNK i miRNK mogu dovesti do *RNAi* procesa kod životinja i biljaka (Schwab i sar. 2006). Dvolančane RNK (engl. „*Double-stranded RNA*“, dsRNK), koje mogu biti transkribovane sa gena u ćeliji ili gena infektivnih patogena, ili veštački unete u ćelije (transgene dsRNK), se obrađuju u nekoliko manjih dvolančanih molekula u citoplazmi pomoću enzima sličnog ribonukleazi III po imenu Dicer. Tada nastaje siRNK molekul, koji stupa u interakciju sa proteinima RNK-indukovanog kompleksa utišavanja (engl. „*RNA-induced*

silencing complex“, RISC) i na taj način ga aktivira (**Slika 9.**) (Hutvágner i Zamore 2002, Bologna i Voinnet 2014). Komponenta RISC kompleksa, protein Argonaut 2 (AGO2), iseca „putnički” *sense* lanac siRNK, dok vodeći *antisense* lanac ostaje povezan za RISC. Zatim, vodeći lanac usmerava RISC do ciljne iRNK radi njenog isecanja, što često za posledicu ima degradaciju ciljne RNK. Na taj način se post-transkripcionim utišavanjem smanjuje nivo prevedenih proteina ciljne iRNK (Schwab i sar. 2006, Hung i Slotkin 2021, **Slika 9.**).

Molekuli miRNK, slično siRNK, mogu da inhibiraju gensku ekspresiju na post-transkripcionom nivou. Iako se mehanizmi utišavanja gena između siRNK i miRNK razlikuju, oba procesa uključuju enzime kao što su Dicer i RISC kompleks i funkcije enzima se delimično preklapaju. Geni za miRNK se transkribuju pomoću RNK polimeraze II u nukleusu kako bi se formirala primarna miRNK (pri-miRNK), koja sadrži 5′ kapu, 3′ poliadenilovani rep i strukturu u obliku petlje (Kim 2005, Bhaskaran i Mohan 2014) (**Slika 9.**). Nakon toga, pri-miRNK se obrađuje kako bi se formirala prekursorska miRNK (engl. „*pre-miRNA*“), koja sadrži 70–100 nt sa isprepletanim mismečevima i formira savijenu petlju. Pre-miRNK se kasnije transportuje iz nukleusa u citoplazmu pomoću enzima Eksportin-5, gde je enzim Dicer obrađuje u miRNK dupleks od 20–24 nt. Zatim se dupleks miRNK povezuje sa proteinom AGO2 kako bi se formirao RISC kompleks, nakon čega se bira „vodeći“ *antisense* lanac miRNK, dok se „putnički“ *sense* lanac odbacuje (za razliku od siRNK, gde AGO2 u RISC kompleksu uzrokuje degradaciju „putničkog“ lanca siRNK) (**Slika 9.**). U zavisnosti od stepena homologije sa ciljnom iRNK, miRNK može izazvati ili isecanje iRNK (u slučaju potpune homologije) ili inhibiciju translacije (u slučaju delimične homologije). Kod biljaka, većina miRNK ima potpunu homologiju ili mali broj mismečeva (< 5) sa svojim ciljnim iRNK, što dovodi do isecanja ciljne sekvence i inhibicije translacije ciljnog gena (Llave i sar. 2002, Jones-Rhoades i sar. 2006, Cui i sar. 2017).

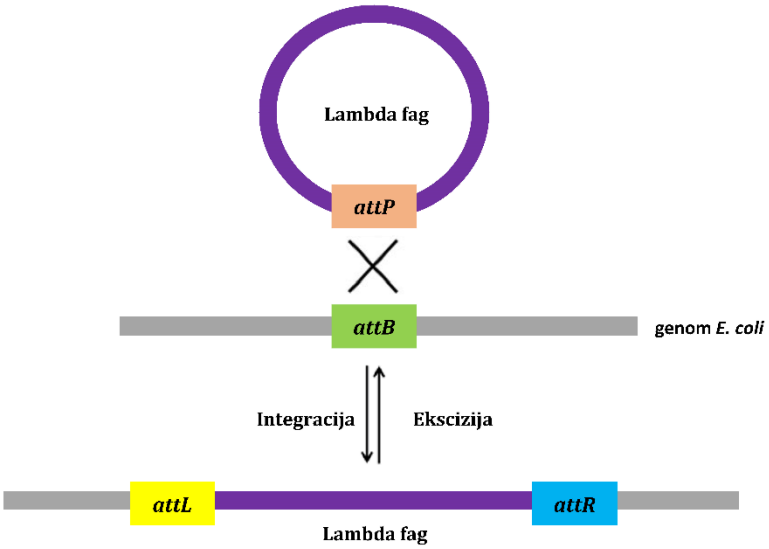
Veštačke miRNK (engl. „*Artificial microRNAs*“, *amiRNAs*) su sintetički molekuli dizajnirani da imitiraju endogene miRNK i regulišu ekspresiju gena na specifičan način (Schwab i sar. 2006, Schwab i sar. 2010). One se dizajniraju korišćenjem tehnika genetičke manipulacije kako bi se u ćeliju introdukovala specifična „vodeća“ sekvenca koji je komplementarna ciljnoj sekvenci iRNK od interesa. Ova sekvenca usmerava *amiRNA* prema svojoj ciljnoj iRNK, gde može izazvati utišavanje gena putem sličnih mehanizama kao prirodne miRNK (Schwab i sar. 2006, Schwab i sar. 2010). Vektorski konstrukti sa *amiRNA* sekvencama omogućavaju istraživačima fleksibilan pristup za proučavanje funkcije gena i manipulaciju genske ekspresije u postupcima kloniranja. *AmiRNA* sekvence su dizajnirane tako da specifično utiču na ciljni gen, na taj način omogućavajući preciznu kontrolu nad utišavanjem gena. Ova tehnologija ima primene u osnovnim istraživanjima i biotehnologiji, omogućavajući ispitivanje funkcije gena i dobijanje genetički modifikovanih organizama sa željenim osobinama (Barh i sar. 2015).



Slika 9. Mehanizmi utišavanja gena pomoću siRNK i miRNK kod biljaka. siRNK: dsRNK (transkribovana ili veštački introdukovana u nukleus) se obrađuje DICER enzimima u siRNK koja se vezuje za RISC. AGO2, koji je komponenta RISC kompleksa iseca „putnički" lanac u siRNK. Vodeći lanac tada navodi aktivirani RISC do ciljne iRNK. Potpuno komplementarno vezivanje između vodećeg lanca siRNK i ciljne iRNK dovodi do degradacije iRNK. miRNK: gen za miRNK se ili transkribuje pomoću RNK polimeraze II u nukleusu kada nastaje pri-miRNK ili se veštački unosi u ćelije (*amiRNA*). Pri-miRNK se obrađuje pomoću DROSHA enzima kako bi se formirala pre-miRNK. Pre-miRNK se pomoću enzima Eksportin-5 transportuje u citoplazmu gde se obrađuje pomoću enzima DICER do miRNK-miRNK* dupleksa. miRNK se integriše u RISC gde se „putnički" lanac odbacuje, a RISC se navodi vodećim lancem do ciljne iRNK putem komplementarnog vezivanja, kada dolazi do isecanja i degradacije ciljne iRNK. Preuzeto i modifikovano prema Lam i sar. (2015).

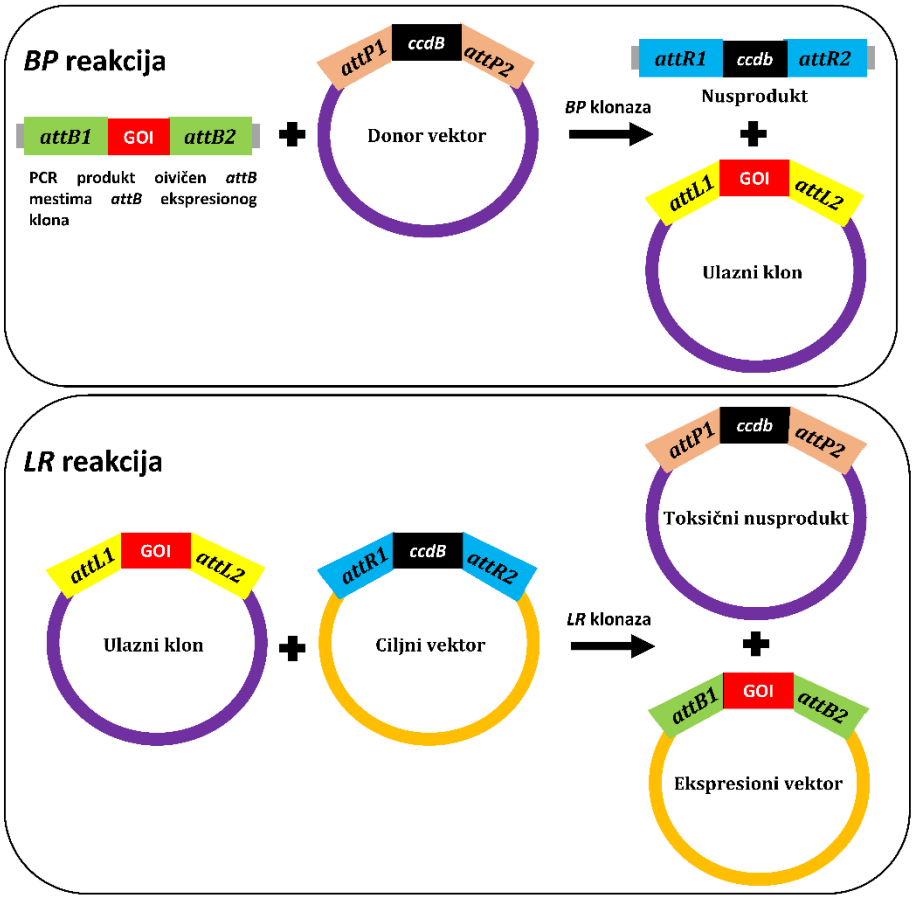
1.8. *Gateway* kloniranje radi pravljenja genskih konstrukata

Metoda kloniranja *Gateway*, koju je razvio *Invitrogen* (Voltam, SAD), je *in vitro* podražavanje reakcija rekombinacije integracije i ekscizije koje se dešavaju kada lambda fag inficira bakterije (Katzen 2007). *In vivo*, ove reakcije rekombinacije su omogućene rekombinacijom mesta vezivanja faga (*attP*) i bakterija (*attB*) (**Slika 10.**). Kao rezultat rekombinacije između *attP* i *attB* mesta, fag se integriše u bakterijski genom okružen sa dva nova mesta rekombinacije (*attL* - levo- i *attR* - desno mesto) (Hartley 2002). Pod određenim uslovima, *attL* i *attR* mesta mogu da se rekombinuju, što dovodi do ekscizije faga iz bakterijskog hromozoma i ponovnog uspostavljanja *attP* i *attB* mesta (**Slika 10.**).



Slika 10. Reakcije integracije i ekscizije lambda faga. Rekombinacijom između *attP* i *attB* mesta nastaju *attL* i *attR* mesta. Preuzeto i modifikovano prema Soriano Maria (2017, January 12).

Gateway vektori sadrže modifikovane verzije *att* mesta tako da istraživači mogu lako da kloniraju svoje željene DNK sekvence. *Gateway* tehnologija se oslanja na dve reakcije. *BP* reakcija se odvija između *attB* mesta koja oivičuju insert i *attP* mesta donorskog vektora (**Slika 11.**). Ovu reakciju katalizuje mešavina enzima *BP* klonaze kada se generiše ulazni klon koji sadrži DNK od interesa, okruženu *attL* mestima. Kao nusprodukt reakcije, gen *ccdB*, koji kodira za toksični protein koji dovodi do ćelijske smrti, iseca se iz donorskog vektora (Chee i Chin 2015). *LR* reakcija se odvija između *attL* mesta generisanog ulaznog klona i *attR* mesta ciljnog vektora (**Slika 11.**). Ovu reakciju katalizuje mešavina enzima *LR* klonaze. Kao rezultat, generiše se ekspresioni klon sa DNK od interesa koja je okružena *attB* mestima. Kao i u *BP* reakciji, fragment DNK koji sadrži *ccdB* gen se iseca iz ciljnog vektora (Chee i Chin 2015). Ekspresioni klon, koji sadrži i selektabilni marker za detekciju ćelija koje sadrže DNK od interesa, ubacuje na kraju u odabrani soj *Agrobacterium* zarad transformacije biljaka.



Slika 11. Šematski prikaz *Gateway* rekombinacije. Sistem implementira proces integracije faga u *BP* i *LR* reakcije. *BP* reakcijom nastaje ulazni klon sa *attL* mestima. *LR* reakcija stvara ekspresioni klon sa svim komponentama neophodnim za ekspresiju gena. GOI – gen od interesa. Preuzeto i modifikovano prema Soriano Maria (2017, January 12).

1.9. Opšte odlike *Centaurium erythraea* Rafn.

Rod *Centaurium* obuhvata oko 28 jednogodišnjih ili dvogodišnjih vrsta i podvrsta u okviru familije Gentianaceae (familija lincura), koje su prvenstveno rasprostranjene u Mediteranskom basenu (El Menyiy i sar. 2021). *C. erythraea* je najšire rasprostranjena vrsta roda; veoma je polimorfna, sa diploidnim, tetraploidnim i heksaploidnim varijetetima i podvrstama, među kojima tetraploidi imaju veće područje rasprostranjenja (Ubsdell 1976). *C. erythraea*, podvrsta *erythraea* Rafn. (sinonim: *Centaurium umbellatum* Gilib., obična, evropska ili mala kičica) je dvogodišnja lekovita biljka sa širokom ekološkom tolerancijom. Kičica je rasprostranjena u većem delu Evrope, delovima Azije, Afrike i naturalizovana je u drugim umerenim regionima (Šiler i Mišić 2016), gde naseljava različita staništa, kao što su obale reka, rubovi šuma, kao i krečnjačko suvo i peskovito zemljište (Schat i sar. 1989, Schouppe i sar. 2017).

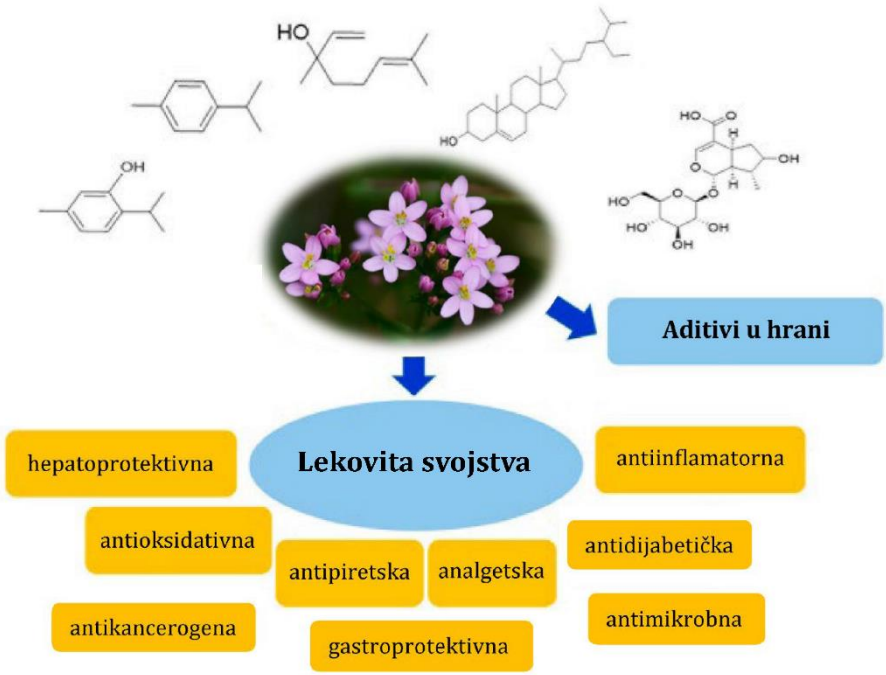
Stablo kičice raste uspravno, pojedinačno ili u grupama od dve do pet stabljika koje polaze iz zajedničke baze. U gornjem delu stabljika se razgranava, a grane su uspravne (Paniagua-Zambrana i Bussmann 2020). Prizemni listovi su jajasti ili eliptični (10-50 x 8-20 mm) i formiraju rozetu. Listovi na stabljikama su kraći, uski i oštri, naspramno raspoređeni. Cvetovi se nalaze u račvastim, štitastogrozdastim cvastima (**Slika 12.**). Svaki cvet je dug oko 10 mm i širok do 10 mm. Latice cveta su ovalne, tupaste, svetlo ružičaste boje. Plod je uska i izdužena čaura, duga oko 10 mm sa brojnim smeđim, nepravilno sferičnim semenima (Paniagua-Zambrana i Bussmann, 2020). Klijanje semena kičice se odvija u martu. Faza cvetanja

traje od juna do avgusta, a biljka može dostići fazu senescencije u septembru (Paniagua-Zambrana i Bussmann, 2020).

Slika 12. Izgled biljke *Centaurium erythraea* Rafn. u prirodnom okruženju. [Slika: Karin Jaehne/ Shutterstock.com].

C. erythraea je drevna lekovita biljka sa najdužom tradicijom u mnogim farmakopejama - opisana je pre gotovo 2000 godina od strane Dioskorida (Simonović i sar. 2020). Nadzemni deo biljke, *Centaurii herba*, se tradicionalno koristi za spravljanje gorkih tinktura, tonika, losiona ili čajeva za lečenje raznih bolesti. Gorak ukus duguje prisustvu sekoiridoida. Sekoiridoidni glukozidi se primenjuju za lečenje različitih problema sa varenjem i kao gastroprotektivni (Tuluce i sar. 2011) i hepatoprotektivni agensi (Saab i sar. 2004). Drugi važni sekundarni metaboliti uključuju ksantone (Valentão i sar. 2002), kao i alkaloide, terpenoide, fenolne kiseline, flavonoide, masne kiseline, alkane i voskove (Subotić i sar. 2006, Šiler i sar. 2014), od kojih su neki sastojci eteričnih ulja kičice (Jovanović i sar. 2009). Kičica takođe pokazuje značajna antioksidativna (Kirbağ i sar. 2009, Šiler i sar. 2014, Božunović i sar. 2018), antidijabetička (Hamza i sar. 2010, Đorđević i sar. 2019), antimikrobna (Šiler i sar. 2014), antiinflamatorna (Berkan i sar. 1991), analgetska (Berkan i sar. 1991), antipiretska (Berkan i sar. 1991) i antikancerogena (Bouyahya i sar. 2019) svojstva (**Slika 13.**), koja su u korelaciji sa njenim fitohemijskim sastavom. Kičica se takođe može koristiti u prehrambenoj industriji kao prirodna aroma ili aditiv (Šiler i sar. 2014).

Prirodne populacije kičica su značajno iscrpljene zahvaljujući ekstenzivnoj i nekontrolisanoj eksploataciji, zajedno sa limitiranim uzgojem zbog nepredvidivog klijanja semena i nemogućnošću rasta u gustim naseobinama, kao i nedovoljnim pokušajima da se populacije obnove (Subotić i sar. 2006). Održivo korišćenje ove lekovite biljke, napori za njeno očuvanje, kao i biotehnološke alternative za proizvodnju njenih sekundarnih metabolita oslanjaju se na razvoj efikasnih *in vitro* tehnika za njenu masovnu propagaciju (Filipović i sar. 2015). Najopsežnije proučavan put razmnožavanja kičice *in vitro* je SE (Simonović i sar. 2020).



Slika 13. Brojna lekovita i prehrambena svojstva *C. erythraea* Rafn.

C. erythraea je relativno laka za rad u kulturi *in vitro*, gde čak može završiti svoj životni ciklus cvetanjem i plodonošenjem. Upravljivost kičice i njena razvojna plastičnost *in vitro* čine je ne samo najistraživanijom vrstom roda *Centaurium*, već i novim modelom u biologiji razvića biljaka. Snažan morfogenetski potencijal eksplantata pogoduje upotrebi kičice za genetičke transformacije (Subotić i sar. 2003, Trifunović-Momčilov i sar. 2013, Trifunović-Momčilov i sar. 2015), interspecijsku hibridizaciju *in vitro* (Šiler i sar. 2012, Šiler i sar. 2014, Banjanac i sar. 2019), proučavanje sinteze sekundarnih metabolita *in vitro* (Subotić i sar. 2006, Subotić i sar. 2009b, Šiler i sar. 2012, Šiler i sar. 2014, Božunović i sar. 2018) i studije o fiziologiji stresa (Šiler i sar. 2007, Trifunović-Momčilov i sar. 2020). Uopšteno, različiti aspekti *in vitro* razvića, fiziologije, farmakologije i ekologije *C. erythraea* proučavani su više od 20 godina na Odeljenju za fiziologiju biljaka, Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu (Simonović i sar. 2020).

1.10. Istraživanja somatske embriogeneze kod kičice

Tokom nekoliko decenija proučavanja kičice na Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta „Siniša Stanković“, ali i u drugim laboratorijama, uspostavljeni su brojni protokoli za različite načine regeneracije, propagacije i genetičke transformacije ove lekovite biljke, uključujući SE iz ćelijske suspenzije (Barešová i Kaminek 1984), eksplantata korenova (Subotić i Grubišić 2007) i listova (Filipović i sar. 2015). Posebna pažnja je posvećena proučavanju arabinogalaktanskih proteina (AGP) tokom SE.

1.10.1. SE indukovana na eksplantatima korenova

Prva uspešna indukcija SE kod kičice postignuta je u suspenziji ćelija dobijenoj iz kulture kalusa (Barešová i Kaminek 1984). Kalus je indukovan iz korenova i izdanaka klijanaca na podlozi obogaćenoj kinetinom (KIN) koncentracije 10^{-6} M i auksinima IAA (koncentracije 10^{-5} M) ili 2,4-D (koncentracije 10^{-6} M). Za razliku od 2,4-D, IAA je pokazala stimulativni efekat na indukciju SE, iako je glavni faktor koji indukuje embriogenezu u ovom sistemu bila svetlost.

Subotić i sar. (2006) su postigli indukciju SE iz kulture korenova kičice na čvrstoj ½MS podlozi bez regulatora rastenja, na svetlosti. Somatski embrioni su se razvijali uporedo sa adventivnim pupoljcima, što znači da su embrioni i pupoljci u različitim fazama razvića mogli biti posmatrani na istim eksplantatima. Histološke analize su pokazale da su **se** nastali direktno iz epidermalnih ćelija, bez faze kalusiranja, dok su adventivni pupoljci nastali iz ćelija korteksa korenova (Subotić i Grubišić 2007). Drugim rečima, SE indukovana na eksplantatima korenova kičice je bila spontana, direktna, asinhrona i odvijala se istovremeno sa organogenezom. Somatski embrioni dobijeni sa eksplantata korenova kičice bili su jednoćelijskog porekla. Iako se SE spontano dešava na korenovima, dodatno su ispitani efekti egzogenih RRB. Subotić i sar. (2009c) su proučavali efekte GA3 i inhibitora njegove sinteze, paklobutrazola, u koncentracijama od 0,01-3,0 μM, na indukciju SE u kulturama divljeg tipa i *hairy* korenova kičice. Uočeno je da GA3 ima inhibitorni efekat na SE, dok je paklobutrazol u svim testiranim koncentracijama pokazao stimulativni efekat.

1.10.2. SE indukovana na eksplantatima listova

Filipović i sar. (2015) su prvi put uspeli da indukuju SE iz eksplantata listova kičice na podlozi koja sadrži CPPU i 2,4-D, koji su primenjeni zajedno. U ovom sistemu, embriogeni odgovor je zavisio od rasta koncentracije CPPU. Pored toga, pravac morfogeneze je zavisio od svetlosnih uslova - kada su eksplantati listova gajeni u mraku, jedini proces koji se dešava je ISE, međutim, kada su eksplantati izloženi svetlosti, procesi ISE i indirektnog razvića izdanaka odvijali su se istovremeno i asinhrono (Filipović i sar. 2015). Iako je ISE moguće izolovati od drugih morfogenetskih putanja gajenjem eksplantata u mraku, veća učestalost indukcije embriogenog kalusa dobijena je na svetlosti. Na osnovu toga, može se zaključiti da je svetlost obavezni faktor za organogenezu u kulturi listova kičice, ali i faktor koji poboljšava ISE (Filipović i sar. 2015).

U kontekstu indukcije SE kod kičice, postoji razlika u preduslovima za dodavanje RRB između dve glavne metode, DSE iz kulture korenova (Subotić i sar. 2006) i ISE iz kulture listova (Filipović i sar. 2015). U cilju razumevanja ove razlike, proučeni su endogeni sadržaji različitih RRB u korenovima i izdancima biljaka koje su uzgajane *in vitro* i koje su služile kao početni eksplantati (Trifunović-Momčilov i sar. 2016). Utvrđeno je da je ukupna količina endogenih citokinina bila 1,4 puta veća u izdancima u odnosu na korenove. Međutim, dominantne forme citokinina u oba organa bile su neaktivni ili slabo aktivni N-glukozidi, dok su slobodne baze i O-glukozidi činili samo mali deo ukupnog citokininskog sadržaja. U korenovima je primećen veći sadržaj IAA, niži odnos između IAA i slobodnih citokininskih baza i niži sadržaj ABA u poređenju sa izdancima. Međutim, najznačajnija razlika je bila 44 puta veći sadržaj SA u korenovima u odnosu na izdanke (Trifunović-Momčilov i sar. 2016). Iako nije jasno koje od ovih razlika omogućavaju spontanu SE iz korenova, a ne iz izdanaka, ranija istraživanja su pokazala da veoma niske koncentracije salicilata mogu indukovati rast ćelija i poboljšati SE kod druge biljne vrste, *Coffea arabica* (Quiroz-Figueroa i sar. 2001).

1.10.3. Uloga antioksidativnih enzima tokom SE

Jedino istraživanje koje se bavi ulogom antioksidativnih enzima u vezi sa SE u okviru porodice Gentianaceae odnosi se na sistem regeneracije i indukcije SE iz eksplanata listova kičice (Filipović i sar. 2015). Filipović i sar. (2015) su proučavali aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i peroksidaze klase III (POX) u različitim uzorcima, uključujući intaktne listove, povređene eksplantate i eksplantate gajene na svetlosti ili u mraku na tri različite podloge. Jedna od tih podloga je bila MS podloga sa dodatkom 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU koja je indukovala ISE. Povreda listova kičice izazvana seckanjem listova na eksplantate

dovela je do povećanja aktivnosti SOD i CAT, kao i smanjenja ukupne aktivnosti POX (Filipović i sar. 2015). Ovi rezultati pokazuju da enzimi CAT i SOD učestvuju u zaštiti listova kičice od oksidativnih oštećenja koja su izazvana povredom.

1.10.4. Ispitivanja uloge AGP proteina tokom SE u kičici

Arabinogalaktanski proteini predstavljaju heterogenu grupu proteoglikana široko rasprostranjenih u biljnom carstvu. AGP su prisutni na ćelijskim membranama, u ćelijskim zidovima i međućelijskim prostorima tkiva i izlučuju se u podlogu za gajenje kultura (Fincher i sar. 1983). Uključeni su u procese rasta i razvića biljaka, kao što su razviće i diferencijacija ćelija (Shi i sar. 2003, Qin i Zhao 2006), razvoj vlakana (Ji i sar. 2003, Liu i sar. 2008) i SE (Egertsdotter i von Arnold 1995, Chapman i sar. 2000, Trifunović-Momčilov i sar. 2014, Simonović i sar. 2015, Trifunović i sar. 2015, Filipović i sar. 2021).

Uloga AGP tokom DSE iz korenova (Trifunović-Momčilov i sar. 2014, Trifunović-Momčilov i sar. 2015) i ISE iz eksplantata listova kičice (Simonović i sar. 2015, Filipović i sar. 2021) je proučavana korišćenjem različitih metoda. Najćešći pristupi su pomoću β-D-glukozil Yariv histohemijskog reagensa (βGlcY) (Anderson i sar. 1977) i monoklonalnih antitela. Kada su korenovi *C. erythraea* korišćeni za indukciju SE na podlozi bez regulatora rastenja, inicijalno su celi eksplantati korenova bili obojeni βGlcY, ali najintenzivnije bojenje je primećeno u epidermalnim ćelijama i vaskularnom tkivu (Trifunović-Momčilov i sar. 2014, Trifunović-Momčilov i sar. 2015). Nakon jedne nedelje u kulturi, βGlcY je intenzivno obojio AGP proteine u površinskim slojevima ćelija eksplantata korenova kičice, gde se verovatno formiraju **se**. S obzirom da **se** nastaju direktno iz epidermalnih ćelija korena (Subotić i sar. 2007), akumulacija AGP u ovom regionu ukazuje na njihovu ulogu u indukciji SE.

Inaktivacija AGP vezivanjem za βGlcY tokom indukcije SE u različitim sistemima obično inhibira SE (Chapman i sar. 2000) i/ili utiče na razvoj i morfologiju embriona (Thompson i Knox 1998, Steinmacher i sar. 2012). Kao što je bilo očekivano, dodavanje βGlcY u induktivnu podlogu tokom indukcije ISE iz eksplantata listova kičice u mraku dovelo je do smanjenja broja **se** po eksplantatu u zavisnosti od koncentracije (Simonović i sar. 2015). Dobijeni rezultati jasno ukazuju na važnost AGP tokom ISE iz eksplantata listova kičice.

2. Cilj rada

Opšti ciljevi ove doktorske disertacije tiču se identifikacije i proučavanja gena koji su aktivni tokom procesa SE u cilju boljeg razumevanja izražene razvojne plastičnosti koju *C. erythraea* pokazuje u uslovima *in vitro*. Druga grana eksperimenata odnosila se na uspostavljanje sistema za indukciju sekundarne ili ciklične SE, koja bi proširila spektar postojećih *in vitro* tehnika za propagaciju i regeneraciju ove vrste koja je sve više prepoznata kao model organizam u biologiji razvića biljaka. Radi postizanja ovih opštih ciljeva, definisani su sledeći pojedinačni ciljevi:

- Sekvenciranje, *de novo* rekonstrukcija i funkcionalna anotacija transkriptoma *C. erythraea*.
- Odabir sekvenci potencijalnih gena markera iz *de novo* transkriptoma.
- Identifikacija diferencijalno eksprimiranih gena u različitim tkivima i stadijumima somatske embriogeneze.
- Evaluacija uticaja genotipa na regenerativnu sposobnost embriogenog kalusa i ekspresije odabranih gena u embriogenom tkivu genotipova sa različitom regenerativnom sposobnošću.
- Uspostavljanje sistema za dobijanje sekundarne, a zatim i ciklične SE.
- Konstrukcija vektora za utišavanje odabranog gena.
- *In silico* karakterizacija odabranog gena i njegovih proteinskih produkata.

3. Materijal i metode

3.1. Biljni materijal korišćen u eksperimentima

3.1.1. Prikupljanje materijala *Centaurium erythraea* Rafn. iz prirode

Cvetale biljke *Centaurium erythraea* Rafn. su sakupljene u zapadnoj Srbiji u blizini puta koji povezuje Čajetinu i Mušvete (43° 45′ 32″ S, 19° 44′ 23″ E), na nadmorskoj visini od ~ 780 m u julu 2016. godine. Biljke su izvučene sa korenom i održavane vlažnim do uzorkovanja sledećeg dana. Uzorci listova (**pcl**), korenova (**pck**), stabljika (**pcs**), zrelih, odnosno otvorenih (**pzc**) i nezrelih, odnosno zatvorenih cvetova (**pnc**) su zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80 °C do izolacije RNK.

3.1.2. Uspostavljanje kulture *in vitro*

Kao polazni biljni materijal za uspostavljanje kulture *in vitro* upotrebljena su komercijalna semena *Centaurium erythraea* Rafn. (*Jelitto Staudensamen GmbH*, *Schwarmstedt*, Nemačka).

Semena kičice su površinski sterilisana u sterilnim uslovima 20% rastvorom natrijum hipohlorita sa 4% aktivnog hlora, a zatim su ispirana sterilnom dejonizovanom vodom četiri puta po tri minuta. Semena su postavljana na ½ MS hranljivu podlogu radi isklijavanja, koja je pored 30 gl^{-1} saharoze, 100 mgl^{-1} mioinozitola (*Sigma-Aldrich*, Misuri, SAD) i 6 gl^{-1} agara (Torlak, Beograd, Srbija) sadržala i odgovarajuće makro i mikro mineralne soli duplo razblaženog sastava, vitamine i kompleks gvožđa po Murashige i Skoog (1962). pH vrednost podloga je podešavana pre sterilizacije na 5,8 pomoću 1N NaOH i/ili HCl. Biljke su gajene u kontrolisanim uslovima na temperaturi 25 ± 2 °C, u uslovima dugog dana (16 h svetlosti/8 h mraka). Izvor svetlosti su obezbeđivale bele fluorescentne lampe (Tesla, Pančevo, Srbija) jačine 65 W. Gustina svetlosnog fluksa od 47 $\mu mols^{-1}m^{-2}$ je određena aparatom LI-1400 *DataLogger* sa LI-190SA *quantum* senzorom (*LI-COR Biosciences*, Bad Homburg, Nemačka).

Nakon tri nedelje od isklijavanja semena, deo klijanaca (**kl**) sa razvijenom radikulom, kotiledonima i prva dva lista je uzorkovan, a deo je prebačen na svežu hranljivu podlogu istog sastava i dalje gajen još dva meseca sve do potpunog formiranja biljaka u stadijumu rozete. Jedan deo listova (**rl**) i korenova (**rk**) rozetastih biljaka je uzorkovan, a drugi deo je iskorišćen za indukciju SE i organogeneze (poglavlje 3.1.3.). Uzorkovani su svi listovi tri meseca starih biljaka, a korenovi su uzimani celi, odsečeni u osnovi rozete. Korenovi rozete su takođe iskorišćeni za pokretanje kultura korenova (**kk**) na MS podlozi. Tkivo kulture korenova je uzorkovano nakon mesec dana u kulturi.

Uzorci su čuvani na - 80 °C do izolacije RNK.

3.1.3. Indukcija somatske embriogeneze i organogeneze *in vitro*

Kao polazni materijal za indukciju SE i organogeneze kod kičice *in vitro*, korišćena su najmlađa dva para naspramnih listova i ceo koren tri meseca starih rozetastih biljaka. Vrhovi listova su odstranjeni, nakon čega su listovi isečeni na eksplantate površine oko 0,5 cm^2 i abaksijalnom stranom postavljani na odgovarajuću hranljivu podlogu. Kulture listova su gajene tokom četiri nedelje u mraku radi indukcije SE ili na svetlosti radi indukcije organogeneze. Korenovi su gajeni isključivo na svetlosti u cilju indukcije organogeneze.

Embriogeni kalus (**ek**), globularni **se** (**gse**) i kotiledonarni **se** (**kse**) su indukovani na odsečcima listova u uslovima kontinualnog mraka na MS podlozi obogaćenoj sa 0,2 mgl^{-1} 2,4-D

i 0,5 mgl^{-1} CPPU. Kombinacija koncentracija RRB je odabrana na osnovu publikovanih rezultata Filipović i sar. (2015), prema kojima je na ovoj kombinaciji zabeležen najviši procenat listova sa formiranim **ek** i **se**.

Pojava organogenog kalusa (**ok**) i adventivnih pupoljaka (**aplh**) indukovana je na eksplantatima listova na MS podlozi sa dodatkom 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU, na svetlosti (najveći procenat listova sa obrazovanim organogenim kalusom i adv. pupoljcima prema Filipović i sar. (2015)). Pored indukcije adv. pupoljaka indirektnom organogenezom, pupoljci su dobijeni i direktno na podlozi bez regulatora rastenja iz eksplantata korenova (**apk**) i listova (**apl**) u uslovima dugog dana.

Uzorci embriogenog i organogenog kalusa, adv. pupoljaka i somatskih embriona su ručno sakupljani nakon četiri nedelje u kulturi, u sterilnim uslovima korišćenjem stereomikroskopa. Embriogeni kalus, globularni i kotiledonarni somatski embrioni su sakupljeni sa istih eksplantata lista, pošto je proces somatske embriogeneze bio asinhron.

Svi uzorci su odmah zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na - 80 °C do izolacije RNK.

3.1.4. Kolekcija tkiva i organa za potrebe sekvenciranja transkriptoma i ispitivanja ekspresije *housekeeping* i diferencijalno eksprimiranih gena tokom SE

Šesnaest uzoraka različitih tkiva gajenih *in vitro* i organa iz prirode u tri biološka ponavljanja (**Tabela 1.**) je upotrebljeno u eksperimentima testiranja stabilnosti *housekeeping* gena i analize ekspresije gena sa pretpostavljenom ulogom u SE. Šest najrelevantnijih uzoraka koji predstavljaju proces organogeneze (**rl**, **rk**, **aplh**) i SE (**ek**, **gse**, **kse**) su dodatno iskorišćeni za *RNA-seq*. Kako bi se smanjio polimorfizam sekvence, svi uzorci za sekvenciranje su poticali od istog klona.

Tabela 1. Uzorci 16 različitih organa i tkiva kičice u kojima je evaluirana stabilnost ekspresije *housekeeping* gena i gena sa potencijalnom ulogom u procesu SE. Polja istaknuta narandžastom bojom označavaju uzorke koji su sekvencirani *RNA-seq* metodom.

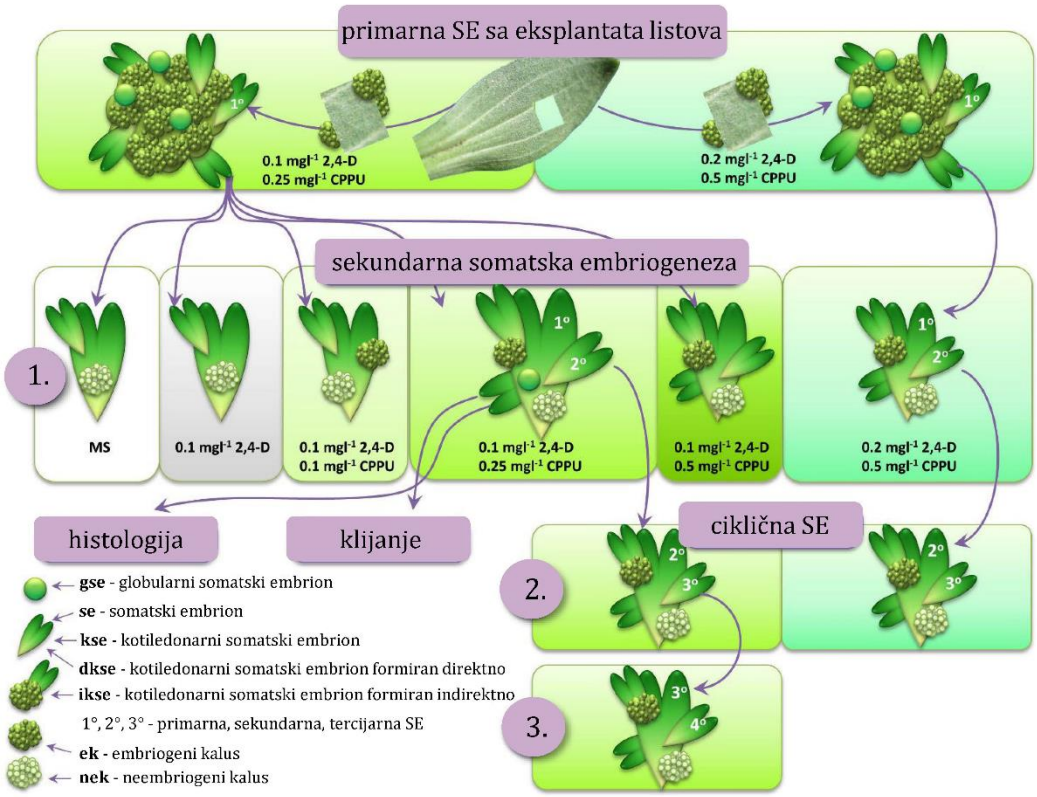
Poreklo biljnog materijala	Naziv uzorka	Oznaka uzorka	Hranljiva podloga	Fotoperiod
biljke gajene *in vitro*	listovi rozete	**rl**	hranljiva podloga bez RRB	16 h svetlost/8 h mrak
	korenovi rozete	**rk**		
	klijanci	**kl**		
	korenovi iz kulture korenova	**kk**		
organogeneza *in vitro*	organogeni kalus	**ok**	0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU	16 h svetlost/8 h mrak
	adv. pupoljci indukovani na eksplantatima listova	**aplh**		
	adv. pupoljci indukovani na eksplantatima listova	**apl**	hranljiva podloga bez RRB	
	adv. pupoljci indukovani na eksplantatima korenova	**apk**		
SE *in vitro*	embriogeni kalus	**ek**	0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU	kontinualni mrak
	globularni embrion	**gse**		
	kotiledonarni embrion	**kse**		
biljke iz prirode	listovi	**pcl**	bez tretmana	prirodno osvetljenje
	koren	**pck**		
	stablo	**pcs**		
	zreli (otvoreni) cvetovi	**pzc**		
	nezreli (zatvoreni) cvetovi	**pnc**		

3.1.5. Indukcija sekundarne somatske embriogeneze

Kao eksplantati za indukciju sekundarne SE korišćeni su primarni **se** u kotiledonarnom stadijumu (**kse**). Primarni **kse** prebačeni su na pet različitih podloga: MS bez RRB i podloge koje sadrže 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i rastuće koncentracije CPPU (0, 0,1, 0,25 i 0,5 mgl^{-1}, **Slika 14.**). Kulture su gajene u uslovima kontinualnog mraka na 25 ± 2 °C. Eksperiment je izveden u sedam ponavljanja (petri kutija) po tretmanu, sa 36 **kse** po ponavljanju. Eksplantati **kse** su sistematski raspoređeni u nizove 6 x 6, numerisani i dokumentovani fotografski i posmatranjem pod binokularnim mikroskopom (*Leica WILD*, *MPS* 28/32, *M3Z*, Veclar, Nemačka). Parametri razvića, kao što su broj eksplantata **kse** koji formiraju bilo koji tip kalusa i posebno embriogeni (**ek**) ili neembriogeni (**nek**) kalus i broj eksplantata **kse** koji formiraju sekundarne **se** bilo kog stadijuma ili porekla i posebno **kse**, formirane direktno (**dkse**) ili indirektno (**ikse**), zabeleženi su nakon četiri nedelje u kulturi.

3.1.6. Indukcija ciklične somatske embriogeneze

Radi indukcije ciklične SE, primarni **kse** obrazovani na eksplantatima listova na podlozi koja sadrži nižu (0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU) ili višu (0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU) koncentraciju RRB, izolovani su i prebačeni na istu podlogu. Kulture su gajene u mraku na 25 ± 2 °C. U prvom ciklusu, sekundarni kse koji su se formirali na bilo kojoj od dve podloge, prebačeni su na sveže podloge uz održavanje istog tretmana (Slika 14.). U drugom ciklusu, tercijarni kse formirani nakon četiri nedelje, prebačeni su na iste sveže podloge radi trećeg i poslednjeg ciklusa. Za tretmane na nižoj kombinaciji koncentracija RRB, eksperiment je izveden u četiri ponavljanja sa 36 kse eksplantata po petri kutiji koja su iskorišćena za evaluaciju parametara razvića nakon četiri nedelje (kao u poglavlju 3.1.5.). Za tretmane na višoj kombinaciji koncentracija RRB, eksperiment je izveden u osam ponavljanja sa 36 kse eksplantata po petri kutiji, od kojih su četiri iskorišćena za evaluaciju parametara razvića nakon četiri nedelje, a četiri su upotrebljena za uzorkovanje embriogenog tkiva koje se obrazovalo u svakom ciklusu SE. Svaki uzorak je bio mešovit i reprezentativan, tj. sadržao je ek, gse i kse koji su se formirali nakon četiri nedelje u svakom ciklusu. Uzorkovano tkivo je odmah zaleđeno u tečnom azotu, a uzorci su čuvani na -80 °C do izolacije RNK.



Slika 14. Šematski prikaz eksperimentalne postavke za dobijanje sekundarne i ciklične SE. Primarni **kse** koji su se obrazovali na eksplantatima listova kičice poslužili su kao inicijalni eksplantati za indukciju sekundarne SE. Ciklična SE je indukovana na dve hranljive podloge. Sekundarni **kse** formirani na 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU su analizirani histološki i proverena im je klijavost. Pravougaonici identičnih boja predstavljaju isti sastav podloge za kulturu.

3.1.7. Klijanje somatskih embriona

Vijabilnost sekundarnih **kse** koji su se obrazovali na podlozi sa 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU, procenjena je u smislu klijanja **se** i njihove konverzije u biljke. Beli neprozirni sekundarni **kse**, dužine 1,5 - 2,5 mm, izolovani su sa primarnih eksplantata **kse** i postavljeni na klijanje na MS podlogu bez RRB. Eksperiment klijanja je sproveden na svetlu sa 105 sekundarnih **kse** i u mraku sa 75 **kse**. Klijavost je evaluirana nakon 25 dana u vidu procenta obrazovanih izdanaka i/ili korenova.

3.1.8. Histološka analiza sekundarnih somatskih embriona

Histološkom analizom proučavana je ontogeneza sekundarnih **se** obrazovanih na podlozi sa 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU. Eksplantati **kse**, zajedno sa **se** u nastajanju, fiksirani su u FAA fiksativu (smeša formaldehida i glacijalne sirćetne kiseline rastvorena u 70% etanolu) tokom 24 h. Uzorci su potom dehidrirani u seriji vodenih rastvora etanola i potopljeni u *Histowax* (*Histolab*, Geteborg Švedska) na 56-58 °C, nakon čega je usledilo kalupljenje materijala. Preseci debljine 5 μm su napravljeni korišćenjem *Reichter* rotacionog mikrotoma (*Reichter*, Beč, Austria) i obojeni hematoksilinom (Johansen 1940). Trajni preparati su posmatrani i fotografisani pod odgovarajućim uvećanjima korišćenjem *Nikon Eclipse E100* svetlosnog mikroskopa (*Nikon*, Tokio, Japan). Sve slike su snimljene kamerom *Bresser MicroCam SP 5.1* i softverom (*Bresser*, Nemačka).

3.1.9. Evaluacija kapaciteta za sazrevanje embriona u različitim genotipovima

Za postavku eksperimenta iskorišćeno je 38 tri meseca starih biljaka kičice u stadijumu rozete, pri čemu je svaka biljka predstavljala jedinstveni genotip poreklom iz semena. SE je indukovana na eksplantatima listova na hranljivoj podlozi obogaćenoj sa 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU. Svaka petri kutija sadržala je po 10 eksplantata listova poreklom od jedne biljke (genotipa) i predstavljala je zasebno biološko ponavljanje. Paralelno sa postavkom eksplantata na indukciju SE, sa svake biljke su uzorkovana i zaleđena tri sledeća najmlađa lista. Nakon četiri nedelje, genotipovi su ocenjeni u pogledu formiranja **ek** i sposobnosti da formiraju **kse**, kao izvesnog markera kasne faze embriogenog odgovora, odnosno kapaciteta za formiranje **kse**, koji je predstavljen kao medijana broja obrazovanih **kse** po eksplantatu nakon četiri nedelje u kulturi. Eksperiment je izveden postupno u periodu od dva meseca, uz poštovanje svih rokova.

Nakon određivanja broja obrazovanih **kse** po eksplantatu, sa tretiranih eksplantata listova su uzorkovane i zaleđene obrazovane embriogene strukture, uključujući **ek**, i **se** u svim stadijumima formirane putem DSE i ISE. Takođe su uzorkovani i zamrznuti eksplantati listova koji su preostali nakon uklanjanja embriogenog tkiva.

Uzorci **rl**, embriogenog tkiva i listova preostalih nakon uklanjanja embriogenog tkiva, prikupljeni su radi provere ekspresije odabranih gena i čuvani na -80 °C do izolacije RNK. Za eksperiment je odabran podskup od devet gena iz transkriptoma kičice koji su navedeni u **Tabeli 3.** i obeleženi simbolom „*”.

3.2. Sekvenciranje transkriptoma *Centaurium erythraea* Rafn.

3.2.1. Sekvenciranje i *de novo* sastavljanje transkriptoma

Sekvenciranje RNK metodom *RNA-seq* je izvedeno na *HiSeq 2500 Illumina* platformi u režimu standardno visokog učinka sekvenciranja sa oba kraja 2 × 101, od strane kompanije *Genomix4Life* (www.genomix.com, Salerno, Italija). Sekvencirana je RNK izolovana iz uzoraka

organogenih tkiva **rl**, **rk**, **aplh** i iz uzoraka embriogenih tkiva **ek**, **gse** i **kse** (**Tabela 1.**) koji su sakupljeni po procedurama opisanim u poglavljima 3.1.2. i 3.1.3.

Šematski prikaz eksperimenta dat je na **Slici 15**. Najpre je proveren kvalitet RNK i uklonjena je rRNK. Usledila je digestija RNK na kratke fragmente od kojih je sintetisano šest biblioteka cDNK pomoću kompleta *TruSeq® Stranded Total RNA Library Preparation with Ribo-Zero™ Plant* (*Illumina*, San Dijego, SAD). Sintetisane cDNK biblioteke, koje predstavljaju kompletne setove RNK koja se eksprimira u tkivima u datom trenutku, podvrgnute su sekvenciranju. Pre dalje analize je proveren kvalitet dobijenih podataka. „Sirova" očitavanja (*.fastq* format) su isfiltrirana kako bi se uklonila očitavanja slabijeg kvaliteta, „prazna" očitavanja i adapterske sekvence. S obzirom na to da je u eksperimentima sekvenciranja kontaminacija ljudskom DNK/RNK relativno česta, isfiltrirana očitavanja visokog kvaliteta su spojena i upoređena sa referentnim genomom *Homo sapiens* (verzija GRCh37) pomoću *STAR* softvera (engl. *„Spliced Transcript Alignment to a Reference"*, verzija 2.4.2a, Dobin i sar. (2013)). Na ovaj način je iz dalje analize odbačeno oko 1000000 očitavanja (1,32%) koja su se mapirala u odnosu na genom čoveka. Preostala „čista" očitavanja iz svih uzoraka su objedinjena i upotrebljena za *de novo* sastavljanje transkripata pomoću *Trinity* alata sa podrazumevanim parametrima (verzija 2.2.0, Grabherr i sar. (2011)).

Radi procene relativne zastupljenosti transkripata u svakom od šest transkriptoma, odnosno kvantifikacije transkripata, očitavanja visokog kvaliteta su najpre poravnata sa sastavljenim *Trinity* transkriptima (objedinjeni referentni transkriptom) pomoću *Bowtie2* alata (Langmead i Salzberg 2012), koji dozvoljava praznine nastale zbog grešaka u sekvenciranju ili kao posledica stvarnih insercija ili delecija. Za kvantifikaciju transkripata korišćen je *RSEM* alat (engl. *„RNA-Seq by Expectation Maximization*", Li i Dewey (2011)) pomoću koga je izračunata vrednost ekspresije na osnovu poravnanja dobijenih sa *Bowtie2*. Na taj način su dobijene normalizovane vrednosti ekspresije u vidu *FPKM* vrednosti (engl. *„Fragments Per Kilobase of target transcript length per Million reads mapped*").

3.2.2. Funkcionalna anotacija transkriptoma

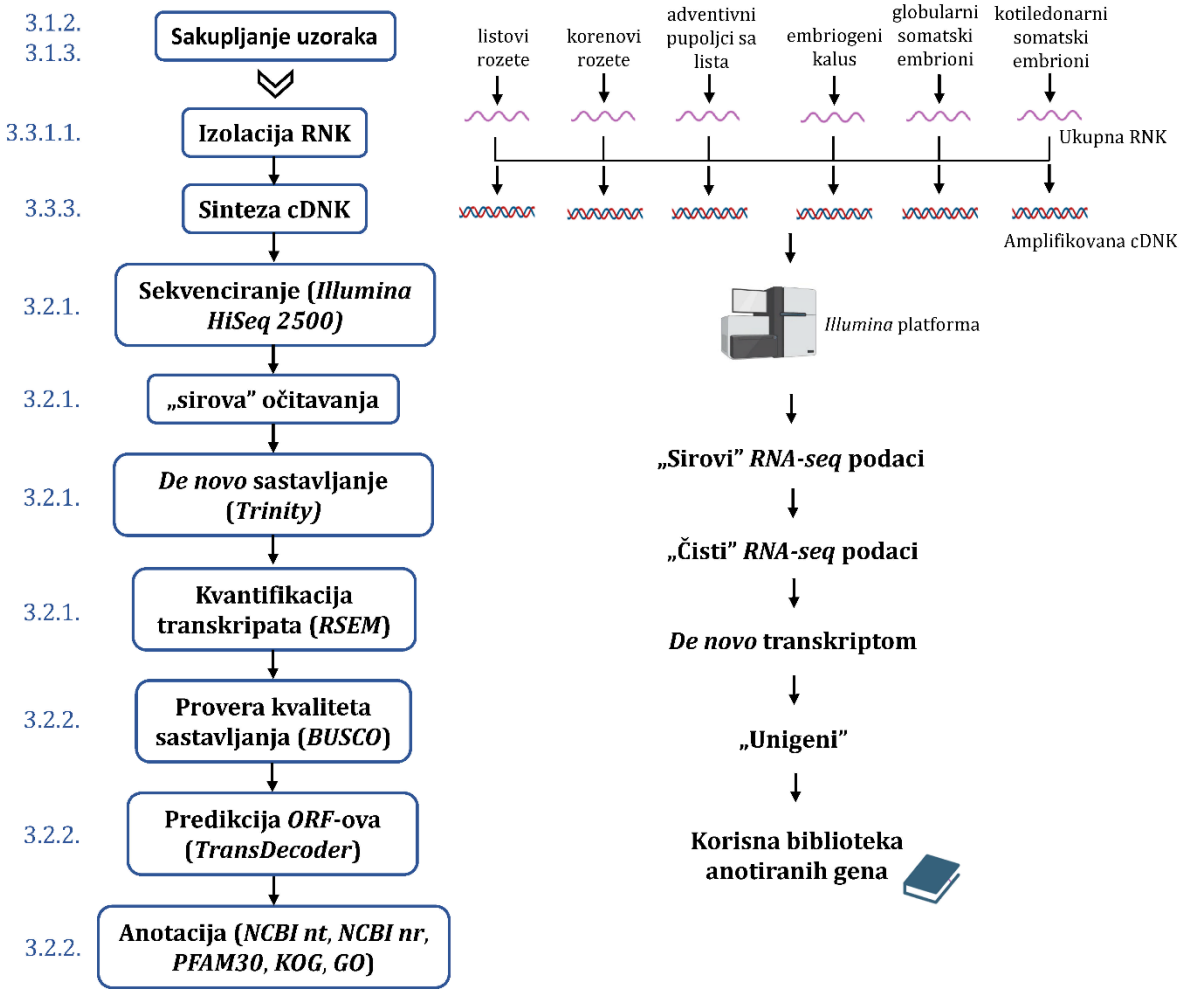
Jedan od načina za proveru kvaliteta sastavljanja transkriptoma jeste evaluacija njegove pokrivenosti. Pokrivenost transkriptoma kičice je evaluirana pomoću *BUSCO* (engl. *„Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*") gena odabranih iz *OrthodDB* baze (https://www.orthodb.org/), najvećeg resursa funkcionalne anotacije ortologa (Kriventseva i sar. 2018). Set *BUSCO* gena iz biljaka (viridiplantae_odb10, http://busco.ezlab.org/) je poravnat sa referentnim transkriptomom kičice, a rezultati su interpretirani primenom *BUSCOI,* verzija 3 (Simão i sar. 2015, Waterhouse i sar. 2017).

U sastavljenom transkriptomu *C. erythraea* su identifikovane sekvence otvorenog okvira čitanja i *in silico* prevedene u proteinske sekvence pune dužine korišćenjem alata *TransDecoder*, koji je dostupan u okviru *Trinity* softvera. *TransDecoder* koristi informacije o rasporedu nt, dužini *ORF*-a i *Pfam* domena (Haas i sar. 2013) kako bi identifikovao protein-kodirajuće regione na *„Trinity"* transkriptima. Pored toga, na sastavljenom referentnom transkriptomu izvedena je *„six-frame*" translacija sa minimalnom dužinom *ORF*-a od 50 ak koja se prevodi u protein. Ovi prevedeni proteini su spojeni sa prediktovanim proteinima dobijenim pomoću alata *TransDecoder*. Na taj način su zadržani i dalje analizirani samo jedinstveni *ORF*-ovi za svaku sekvencu transkripta.

Sastavljeni transkripti su anotirani tako što su mapirani na *NCBI* nukleotidnu (*nt*) i *Swissprot* proteinsku bazu podataka (u okviru *NCBI nr* baze) pomoću *BLASTn* i *BLASTx* algoritama. Predviđeni proteom je anotiran poravnanjem prema proteinskoj bazi ortologa (engl. *„Eukaryotic orthologous groups*", *KOG*) preko servera *WebMGA* (https://weizhong-

lab.ucsd.edu/webMGA/server/kog/, Wu i sar. (2011)). Pored toga, radi dodatne anotacije proteoma, sekvence su poravnate sa bazom proteinskih familija, *PFAM30* (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/Pfam/releases/Pfam30.0). *PFAM30* implementira probabilističke modele (skrivene Markovljeve modele, engl. „*hidden Markov models*“) u okviru *HMMER3* 3.1b2 softvera koji se koriste za statističko određivanje homologije (Eddy 2011).

Kako bi se sastavljene sekvence funkcionalno okarakterisale, njima su dodeljeni *GO* termini ili klase. *GO* pruža informacije o biološkom domenu u odnosu na tri aspekta: molekularnu funkciju, ćelijsku komponentu i biološki proces (Ashburner i sar. 2000). Dodeljivanje *GO* klasa je učinjeno primenom dva pristupa: *Blast2GO* (Conesa i sar. 2005, Conesa i Götz 2008), koji na osnovu homolognih sekvenci omogućava dodeljivanje *GO* termina neanotiranim sekvencama kičice; i *Pfam2GO* (https://current.geneontology.org/ontology/external2go/pfam2go), koji omogućava mapiranje *GO* termina do identifikovanih *PFAM* unosa.



Slika 15. Ilustracija postupaka tokom sekvenciranja i *de novo* sastavljanja transkriptoma kičice. Proces obuhvata pripremu šest cDNK biblioteka, sekvenciranje RNK i analizu podataka iz *de novo* transkriptoma. Sa leve strane ilustracije date su oznake poglavlja u kojima su dati procesi opisani. Ilustracije su napravljene pomoću *BioRender* softvera (https://www.biorender.com/).

3.2.3. Deponovanje podataka iz projekta sekvenciranja transkriptoma *C. erythraea* Rafn.

Sekvence iz transkriptoma, *FPKM* vrednosti genske ekspresije i *NCBI nt*, *Swissport* i *PFAM30* anotacije su dostupne na *Zenodo* platformi za deljenje istraživanja

(https://zenodo.org/record/3591805, https://doi.org/10.5281/zenodo.3591805) pod otvorenim pristupom *Creative Commons Attribution* 4.0 međunarodne sekvence.

3.2.4. Odabir tkivno-specifičnih i diferencijalno eksprimiranih gena iz transkriptoma kičice

Za otkrivanje tkivno-specifičnih i DEG tokom organogeneze i SE, upotrebljeni su podaci iz transkriptoma kičice. DEG su odabrani na osnovu pažljivo definisanih uslova koji se odnose na *FPKM* vrednosti transkripata, za koje je očekivano da odgovara nivou njihove ekspresije (Grabherr i sar. 2011). Za tkivno-specifično eksprimirane gene u uzorcima **rl**, **rk**, i **aplh**, odabrani su oni sa *FPKM* vrednošću od najmanje jedan u ciljnom tkivu i barem osam puta većom ekspresijom u odnosu na sva ostala tkiva. Kako bi se detaljnije okarakterisala ekspresija gena tokom SE, postavljena su četiri kriterijuma za filtriranje. Kao DEG u **ek** izdvojeni su svi geni sa *FPKM* ≥ 1 u **ek**, većom ekspresijom u **ek** nego u **gse** i barem osam puta većom ekspresijom u **ek** u odnosu na **rl**, **rk**, **aplh** i **kse**. Za gene koji potencijalno mogu biti aktivni tokom ranih faza formiranja somatskih embriona, odabrani su oni sa *FPKM* ≥ 1 u **ek** ili **gse** ili barem osam puta većom ekspresijom u jednom od njih u odnosu na **aplh**. DEG tokom kasne faze SE su identifikovani kao svi geni sa *FPKM* ≥ 1 u **kse**, većom ekspresijom u **kse** odnosu na **gse** i barem osam puta većom ekspresijom u **kse** u odnosu na **rl**, **rk**, **aplh** i **ek**. Na kraju, izdvojena je grupa gena koja zadovoljava najstrože kriterijume: *FPKM* ≥ 1 u **ek** i **gse** i **kse** i barem osam puta veća ekspresija u svakom od njih u odnosu na organogena tkiva (**rl**, **rk**, **aplh**). Radi planirane buduće transformacije kičice konstruktima za utišavanje najinteresantnijeg gena, vođeno je računa da *FPKM* u **aplh** bude nula ili jako blizu nule, kako bi bila omogućena regeneracija transformisanih biljaka preko adventivnih pupoljaka.

Sekvence DEG su funkcionalno anotirane pomoću *Blastn* i *Blastx* algoritama u odnosu na *nt* nukleotidnu i *SwissProt* proteinsku bazu sekvenci biljaka iz *NCBI*, kao i sve ostale sekvence transkriptoma. Sekvence za koje su pronađena poklapanja u datim bazama su dalje učitane u *UniProt* (Consortium 2022) i *Blast2GO* (Conesa i Götz 2008) kako bi se dobile detaljnije informacije o funkciji, uključujući *GO* klasifikaciju i *PFAM* proteinske domene. Posebna pažnja je posvećena sekvencama sa funkcionalnom anotacijom koje imaju zadovoljavajuću E vrednost i dužinu. U ovom slučaju, samo sekvence sa E vrednošću manjom od 1 E^{-15} prema *SwissProt* bazi su uzete u obzir imajući u vidu činjenicu da niža E vrednost ukazuje na biološki korektniju anotaciju (Ponting 2001). Kada su prilikom karakterizacije gena predviđanja *SwissProt* i *nt* baze bila suprotstavljena, prioritet je dat *SwissProt* bazi.

3.3. Molekularno-biološke metode

3.3.1. Izolacija RNK

3.3.1.1. Izolacija RNK pomoću *TRIzol* reagensa

Izolacija RNK iz uzoraka koji obuhvataju različite organe i faze razvića kičice, kao i uzoraka embriogenog tkiva poreklom od različitih genotipova, urađena je pomoću *TRIzol* reagensa prema uputstvima proizvođača. *TRIzol* reagens (sadrži, 0,4 M amonijum tiocijanat, 0,8 M guanidin tiocijanat, 0,1 M natrijum acetat pH 5,0, 5% glicerol i 38% fenol ekvilibrisan u Tris puferu pH 8,0) je pripremljen u laboratoriji. Oko 500 mg zamrznutog biljnog tkiva po uzorku je samleveno u sterilnim avanima uz pomoć tečnog azota do praha i svakom uzorku je dodato 1 ml *TRIzol* pufera. Nakon inkubacije uzoraka na sobnoj temperaturi tokom 5 min, u svaki uzorak je dodato 200 µl rastvora hloroform-izoamil alkohola (*v*:*v*=24:1) i smeša je vorteksovana. Zatim su uzorci inkubirani na sobnoj temperaturi 3 min, nakon čega je usledilo centrifugiranje 10 min

pri 12000 g na 4 °C. Vodena faza je prebačena u nove sterilne mikrotube, gde je dodato 250 µl izopropanola i pufera za precipitaciju RNK (sadrži 0,4 M natrijum hlorida, 0,8 M natrijum citrata i 0,8 M hlorovodonične kiseline). Radi precipitacije RNK, uzorci su inkubirani na -20 °C tokom 30 min ili duže. Nakon centrifugiranja 10 min pri 12000 g, supernatant je uklonjen, a precipitat RNK je ispran sa 1 ml hladnog 75% etanola napravljenog sa sterilnom vodom tretiranom sa 0,05% (v/v) dietilpirokarbonatom (*DEPC*, *Sigma-Aldrich*, Nemačka) radi inaktivacije ribonukleaza. Etanol je uklonjen, a precipitat RNK je osušen u laminarnoj komori i rastvoren u odgovarajućoj zapremini sterilne vode za injekcije.

Koncentracija RNK i potvrda kvaliteta (odnos intenziteta apsorbanci A_{260}/A_{230} i A_{260}/A_{280}) su određene na *Nanodrop* aparatu (*N60 Nano-Photometer®*, *Implen GmbH*, Nemačka). Ukoliko se odnos A_{260}/A_{280} kreće između 1,9-2,1, smatra se da je RNK zadovoljavajućeg kvaliteta.

Izolovani uzorci RNK su čuvani na temperaturi -80 °C do daljeg korišćenja.

Šest uzoraka za sekvenciranje su poslata kao talog u apsolutnom etanolu kompaniji za sekvenciranje *Genomix4Life* (www.genomix.com, Salerno, Italija), gde je integritet RNK (engl. „*RNA Integrity Number*“, *RIN*) testiran pomoću *TapeStation 4200*. Svi uzorci za sekvenciranje RNK su imali zadovoljavajući *RIN* iznad 8.

3.3.1.2. Izolacija RNK kompletom za izolaciju RNK iz male mase tkiva

Izolacija RNK iz uzoraka embriogenog tkiva poreklom iz različitih ciklusa SE obavljena je pomoću *NucleoSpin® RNA Plant* kompleta (*Macherey-Nagel*, Nemačka), koji je prilagođen sa izolaciju RNK iz uzoraka sa masom manjom od 100 mg. Uzorci biljnog tkiva su samleveni u *Eppendorf* mikrotubama (*RNase-free, Eppendorf,* Hamburg, Nemačka) u tečnom azotu uz pomoć plastičnih sterilnih tučkova, a zatim je svakom uzorku dodato 350 µl *RA1* pufera (guanidinijum tiocijanat) i 3,5 µl β-merkaptoetanola radi potpune denaturacije ćelija. *RA1* pufer za liziranje ćelija inaktivira RNK-aze i stvara optimalne uslove vezivanja koji poboljšavaju adsorpciju RNK na silika membrane. Lizat je filtriran kroz *NucleoSpin®* kolone za centrifugiranje na 11000 g tokom 1 min i prenet u nove sterilne mikrotube. U uzorke homogenizovanih lizata je dodato 350 µl 70% *DEPC*-tretiranog etanola i pažljivo promešano. Pripremljeni uzorci su prebačeni u *NucleoSpin® RNA Plant* kolone i centrifugirani tokom 30 s na 11000 g kako bi se RNK vezala za kolonu. Da bi se uklonio višak soli sa membrana, u svaki uzorak je dodato 350 µl *MDB* pufera, koji su potom centrifugirani tokom 1 min na 11000 g. U posebnoj mikrotubi je pripremljena smeša za digestiju genomske DNK - za svaku izolaciju je dodato 10 µl rDNK-aze u 90 µl pufera. Zatim je 95 µl reakcione smeše dodato direktno na centar silika membrane i uzorci su inkubirani 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga su usledila tri ispiranja silika membrane. Prvo i drugo ispiranje je urađeno nakon dodavanja 200 µl *RAW2*, odnosno 600 µl *RA3* pufera i centrifugiranjem tokom 30 s na 11000 g, a finalno ispiranje sa 250 µl *RA3* pufera, centrifugiranjem tokom 2 min na 11000 g. RNK koja je ostala vezana za membranu je eluirana dodavanjem 60 µl sterilne vode za injekcije i centrifugiranjem tokom 1 min na 11000 g.

Određivanje koncentracije i potvrda kvaliteta RNK urađeni su kako je opisano u poglavlju 3.3.1.1.

Izolovani uzorci RNK su čuvani na temperaturi -80 °C do upotrebe.

3.3.2. Tretman dezoksiribonukleazom

Kako bi se uklonili ostaci genomske DNK, izolovana RNK je tretirana dezoksiribonukleazom I (DNaza I) koristeći komercijalno dostupni komplet (*DNase I*, *Thermo Scientific, Voltam*, SAD). Sastav reakcione smeše prikazan je u **Tabeli 2**.

Tabela 2. Sastav reakcione smeše za tretman DNazom I.

Komponenta	Zapremina (µl)
RNK u vodi (2 µg)	6,5
10x reakcioni pufer za DNK-azu I	1
DNaza I (1U/µl)	2
Inhibitor RNK-aza (40 U/µl)	0,5
Ukupno	10

Uzorci su inkubirani u *Mastercycler® nexus Gradient* aparatu (*Eppendorf*, Hamburg, Nemačka) tokom 30 minuta na temperaturi od 37 °C. Nakon toga, kako bi se inaktivirala DNaza, u reakciju je dodato 1 µl 25 mM EDTA, a uzorci su inkubirani 10 min na temperaturi od 65 °C. Na kraju ovog koraka, dobijeno je 11 µl RNK po uzorku, koji su zatim dalje korišćeni u reakciji sinteze komplementarne DNK (cDNK).

3.3.3. Reverzna transkripcija

Za reakciju reverzne transkripcije (RT) radi prevođenja RNK u komplementarne jednolančane DNK molekule (cDNK), upotrebljen je komplet *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (*Thermo Scientific*, Voltam, SAD) u skladu sa preporukama proizvođača. Sastav reakcione smeše dat je u **Tabeli 3**.

Tabela 3. Sastav reakcione smeše za RT.

Komponenta	Zapremina (µl)
RNK (2 µg)	11
Oligo (dT) prajmer	1
5x reakcioni pufer	4
Inhibitor RNK-aza (20 $Uµl^{-1}$)	1
dNTP miks (10 mM)	2
RT (*RevertAid*™, 200 $Uµl^{-1}$)	1
Ukupno	20

Pripremljeni uzorci su inkubirani 60 minuta na 42 °C, a reakcija je zaustavljena zagrevanjem na 70 ˚C tokom 5 min kako bi se inaktivirala reverzna transkriptaza.

Uzorci su čuvani na -80 °C do upotrebe.

3.3.4. Konstrukcija prajmera za *housekeeping* gene i gene sa pretpostavljeno diferencijalnom ekspresijom tokom SE

Sekvence odabranih *housekeeping* i gena sa diferencijalnom ekspresijom tokom SE, pronađene su u transkriptomu kičice pomoću lokalnog *BLAST*-a, pri čemu su neki od ovih gena bili prisutni u više izoformi. Samo transkript pune dužine *18S* rRNK nije bio prisutan u

transkriptomu, već je prethodno deponovan u Banci gena (FR863631, Bogdanović i sar. (2013)). Različite izoforme istog gena su međusobno poravnate pomoću softvera *BioEdit Sequence Alignment Editor* (verzija 7.2.6.1, Hall T (1999)). Prajmeri su konstruisani pomoću *Primer designing* alata na veb-sajtu *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information,* https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), na delu sekvence odabrane izoforme koja ne pripada konzerviranom regionu. Na taj način osigurana je specifičnost amplifikacije samo odabranih izoformi i izbegnute su neželjene amplifikacije. Kvalitet prajmera je proveren na veb-sajtu *NetPrimer* (https://www.premierbiosoft.com/netprimer/), pri čemu je posebna pažnja posvećena detekciji sekundarnih struktura između parova prajmera, kao što su ukosnice, homodimeri i kros-dimeri. Specifičnost prajmera je eksperimentalno potvrđena elektroforezom na agaroznom gelu RT-PCR produkata. Sekvence prajmera *housekeeping* gena date su u **Tabeli 4**, dok su sekvence prajmera odabranih DEG kičice date u **Tabeli 5**.

Tabela 4. Odabrani *housekeeping* geni za testiranje stabilnosti genske ekspresije. U tabeli su navedeni nazivi, skraćenice i *Trinity* oznake testiranih gena, sekvence prajmera (F - direktni, R - reverzni), temperatura vezivanja prajmera sa matricom (Ta), dužina amplikona u bp i efikasnost RT-qPCR amplifikacije (*Eff*). * prethodno deponovana sekvenca u Banci gena.

Naziv gena		***Trinity* oznake transkripata**	**Sekvence prajmera 5 → 3**	**Ta (°C)**	**Dužina amplikona (bp)**	***Eff* (%)**
Gen za histon 3	*H3*	TR18982|c0_g1_i1	F - AGTAATCGGACTCTTCGTCGC R - TCTCTGCCGTTCACCTCAAT	56,9	122	93,12
Gvožđe-superoksid dismutaza 1	*SOD1*	TR27799|c2_g1_i2	F - CTTCTTGATGCCAATGCCTCG R - TACTTCGGTTGCTGGGTTCG	55,1	198	95,58
Gvožđe-superoksid dismutaza 2	*SOD2*	TR26226|c0_g1_i1	F - GTCTTGTGATGCTTTCCCCA R - GACTCGGTGCTTTTCCAGAC	58	171	90,46
RAS-povezani nukleusni protein	*RAN*	TR29032|c0_g1_i1 TR29032|c0_g1_i3 TR29032|c0_g1_i4	F - ACCTTGTTTCCACATAGCAC R - CAGGAGAAGTTTGGCGG	53	167	89,82
β-tubulin	*TUB*	TR34808|c1_g1_i4	F - GGCACACCTGAAATCCTTGG R - TCTTCCGCCCTGATAACTTCG	59	156	92,29
Adenozin kinaza	*AK*	TR27323|c1_g1_i1	F - CTTTAGCCTCACCAGCCTCA R - CCTCGGCGTTCCTCACATT	56,9	167	92,70
Elengacioni faktor 2	*EF2*	TR36212|c4_g1_i1 TR36212|c4_g1_i3	F - CAGACCAACCATAGCAACTG R - CGGGAGAGAAGAAGGACC	53	119	106,97
α-tubulin	*TUA*	TR39712|c0_g1_i1	F - GCGAGCGAAGTTGTTAGCG R - GTCGGAGGCGGAGATGATG	59	104	78,12
TATA-vezujući protein 1	*TBP1*	TR33566|c0_g1_i1 TR33566|c0_g1_i2 TR33566|c0_g1_i3	F - CATCACACGAGCCCACAATG R - AGAGCCAAAAACGACAGCAC	56,9	176	110,95
Ribozomalni protein L2	*RPL2*	TR24453|c0_g1_i1	F - AGGGTCGTGAATGATGTCGG R - CACAGCGTAAGGGAGCAGG	53	137	101,68
18S ribozomalna RNK	*18S*	*FR863631	F - ATGCCCTTAGATGTTCTGGGC R - AAGGGCAGGGACGTAGTCAA	55,1	193	91,74

Tabela 5. Sekvence prajmera za odabrane kandidate za evaluaciju ekspresije gena sa potencijalnom ulogom u SE u kolekciji tkiva kičice. U tabeli su navedene oznake transkripata za odabrane izoforme na čijim sekvencama su dizajnirani prajmeri, T sparivanja prajmera sa matricom (Ta), dužina amplikona i efikasnost RT-qPCR reakcije. Asterisk „*“ označava da su prajmeri korišćeni i za proveru ekspresije u genotipovima sa varijabilnim potencijalom za formiranje **se**, dok oznaka „+“ označava da je prajmer korišćen i za evaluaciju ekspresije u ciklusima sekundarne SE.

Genski produkt/gen		***Trinity* oznake transkripata**	**Sekvence prajmera 5 → 3**	**Ta (°C)**	**Dužina amplikona (bp)**	***Eff* (%)**
Protein iz PR10 porodice alergena	**CePR10*	TR28332|c0_g4_i1	F - CTCATCCACCCTCTGCTTCG R - ATCACTTCCCCAATCTCAGC	56,5	195	97,54
Ribonukleaza 3	*CeRNS3*	TR25654|c0_g1_i1	F - CGGATTTTATTTTAGGTGGCGT R - TGGAGGCGGACTCTATGCT	55,8	176	90,51
DC2.15 proteinu sličan	**CeDC2.15-like*	TR12274|c0_g1_i1	F - ATCCCAACGACAGCACCA R - AGGGCTTGAGAGATGGCTTC	54	173	87,65
Glicinom bogatom proteinu 3 sličan	**CeGRP3-like*	TR3877|c0_g1_i1	F - AGTCCACAGTTTTATTCTGCTCT R - CAGGTGCTGCTACAATGCTAA	56,5	161	95,60
PCC13-62 proteinu sličan	*CePCC13-62-like*	TR30412|c0_g1_i1	F - CCTTCGTCCTTGAGTCCACAT R - TGGCACAAACCCCTTCCTTATT	58,5	213	93,67
ACC3 sintaza	*CeACS3*	TR36872|c0_g1_i2	F - GAGTCTTGCCCATGAGAATTGC R - TCTCGGGGTGGAGGATTGC	58,5	227	92,61
Taumatinu 1 sličan protein	**CeTLP1-like*	TR30219|c0_g1_i1	F - CGTAAGAAAAAGAATGGCAGCAG R - CCTCTTTGAGTTCTTCACTTGGA	58,5	110	88,76
Triptofan aminotransferaza 1	*CeTAR1*	TR20674|c0_g3_i1	F - ATGCCTTGGTAGTCCGTGTC R - GCGTTTGCTGTCCGAGTTG	57,8	122	87,89
IAA32	**CeIAA32*	TR21282|c0_g1_i1	F - TTGAACAGTGCCGATGGAGA R - TGACGAGCAGTGGAGAATGG	58,5	120	94,62
Grečen Hagen 3.6	**CeGH3.6*	TR39668_c4_g1_i1	F - TGCTTTGTGGGCTTTGCTTG R - TCCCTGTTCTGATGTCCTTGC	59,1	129	92,71

Nastavak **Tabele 5.** na strani 37.

Protein sa MADS boks domenom sličan Agamusu 65	*CeAGL65-like*	TR7267|c0_g1_i3	F - ATAATACGATGCTTGTCCGCC R - AGAACCGTGATTGCTCCTAC	56,5	185	104,43
Flavin-monooksigenaza 7	*CeYUC7*	TR46165|c0_g1_i1	F - AGGCATCACTTTCATCATTGTTACC R - CAGGGGAGGCATTTGAAGGAA	58,5	194	95,68
Serin-treonin kinaza 1	*CeSERK1*	TR38192|c1_g2_i6	F - AGTTGATTTGAGGAAGCGTCT R - TTCCCTTTTGCTTCTCTGTCG	56,5	272	88,09
Serin-treonin kinaza	**CeSERK*	TR36471|c1_g1_i1	F - AAAGGTGGCAGTGTGTGTGA R - AAATATCGGGCAGGTTCGGG	58,5	119	100,63
Nepoznati protein 1	**+CeNA1*	TR23240|c0_g1_i1	F - TTAGAGCCACCACAGTCG R - GGTCTTTCCAGAGTGTCATCA	55,1	199	91,40
Nepoznati protein 2	*CeNA2*	TR48752|c0_g1_i1	F - GCAGGTCTCCTTTAGTTCCG R - GCTGTTGGCAGGGATTTTCA	57,1	120	96,75
Nepoznati protein 4	*CeNA4*	TR1001|c0_g1_i1	F - TTCTACCTCTTCTCACACCATCA R - GAGACAGGGGAAACGAGC	56,5	101	96,74

3.3.5. PCR amplifikacije

3.3.5.1. PCR amplifikacije za proveru specifičnosti prajmera i kvaliteta RNK

Specifičnosti prajmera i kvalitet RNK provereni su PCR amplifikacijama po *Fermentas* protokolu. Za PCR je korišćena *Taq* polimeraza (*Thermo Scientific*, Voltam, SAD), a ostale komponente protokola su navedene u **Tabeli 6**. Reakcije su bile zapremine 12,5 µl, sa odgovarajućim koncentracijama cDNK. Za evaluaciju stabilnosti *housekeeping* gena korišćena je koncentracija cDNK od 12,5 ngµl^{-1}, dok je za evaluaciju ekspresije DEG korišćena koncentracija od 50 ngµl^{-1}. Amplifikacija se odvijala u *Mastercycler® nexus Gradient* mašini (*Eppendorf*, Hamburg, Nemačka) po zadatom programu navedenom u **Tabeli 7**. PCR produkti su provereni na agaroznom gelu (poglavlje 3.3.6.).

Tabela 6. Komponente *Fermentas* protokola korišćene u PCR reakcijama.

Komponenta	**Zapremina (µl)**
10x *Taq* pufer sa $(NH4)_2SO_4$	1,25
dNTP miks (10 mM)	0,25
25 mM $MgCl_2$	1
Taq polimeraza (5Uµl^{-1})	0,2
Direktni + reverzni prajmer (10 µM)	1,25
cDNK 50 ngµl^{-1}	2
Voda	6,55
Ukupno	12,5

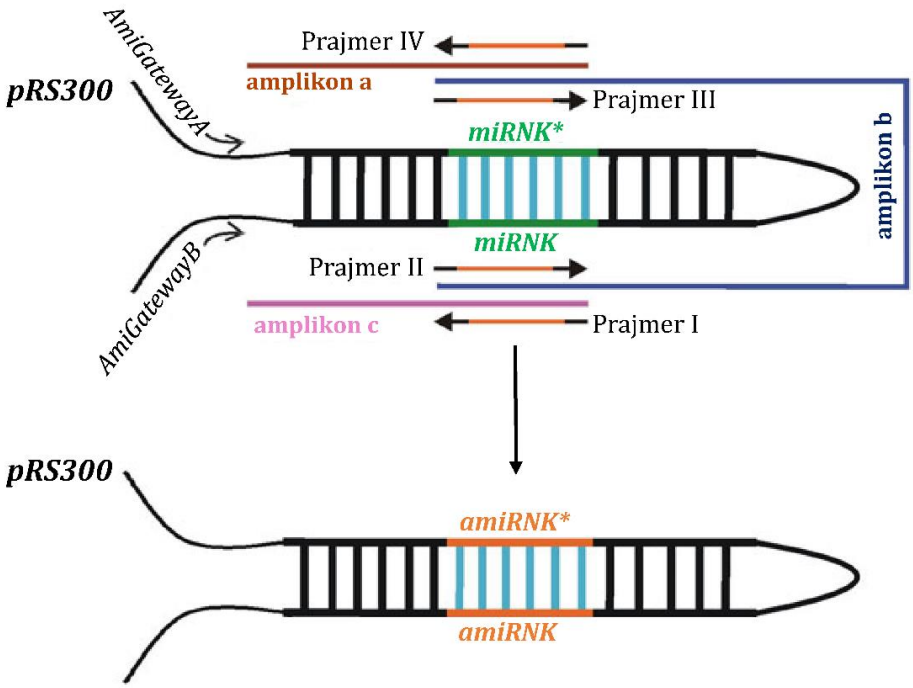
Tabela 7. Program aplifikacije PCR reakcija. * gen specifične temperature su date u **Tabeli 4** i **Tabeli 5**.

Korak	**T (°C)**	**Vreme**	**Broj ciklusa**
Inicijalna denaturacija	95	5 min	1
Denaturacija	95	30	40
Hibridizacija	*	30	
Ekstenzija	72	30	
Finalna Ekstenzija	72	10 min	1
Čuvanje	4	∞	1

3.3.5.2. Preklapajuće PCR reakcije za konstrukciju *amiRNA* fragmenata

Na **Slici 16.** je prikazana šema preklapajućih PCR reakcija kojima su na *pRS300* plazmidu prirodni miRNK fragmenti *A. thaliana* zamenjeni *amiRNA* sekvencama. Prajmeri za ove reakcije (I-IV) su konstruisani na *WMD* platformi (http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi?page=Home;project=stdwmd), dok su prajmeri *AmiGatewayA* i *AmiGatewayB* napravljeni na sekvenci plazmida i modifikovani dodavanjem *attB* mesta (Bogdanović i sar. 2020). U **Tabeli 11**. su navedene korišćene sekvence prajmera.

Najpre je pomoću prajmera *AmiGatewayA* i IV amplifikovan fragment **a**; zatim je prajmerima I i *AmiGatewayB* amplifikovan fragment **c**; i na kraju, fragment **b** je amplifikovan prajmerima II i III (**Slika 16**, **Tabela 8.**). Potom su amplikoni **a**, **b** i **c** iskorišćeni kao matrica za preklapajući PCR, kada je pomoću prajmera *AmiGatewayA i AmiGatewayB* konstruisan *amiRNA* konstrukt sa zamenjenim sekvencama.



Slika 16. Konstrukcija *amiRNA* fragmenta preklapajućim PCR reakcijama. Kao PCR matrica se koristi miRNK *Arabidopsis thaliana* koja se nalazi na *pRS300* plazmidu. Na matrici se nalaze sekvence u *sense* i *anti-sense* orijentaciji, *miR319a* i *miR319a* *, koje se nizom preklapajućih reakcija zamenjuju *amiRNA* i *amiRNA** sekvencama. U reakcijama se koriste oligonukleotidni prajmeri I–IV i prajmeri ***AmiGatewayA i B***, koji su zapravo prajmeri zasnovani na plazmidnoj sekvenci, modifikovani dodavanjem *attB* mesta. Preuzeto i modifikovano prema Fattash i sar. (2012)

Tabela 8. Preklapajuće reakcije (**a-d**) sa odgovarajućim kombinacijama prajmera, matricom i dužinom amplikona.

Reakcija	Direktni prajmer	Reverzni prajmer	DNK matrica	Dužina amplikona (bp)
a	*AmiGatewayA*	IV	*pRS300*	155
b	III	II	*pRS300*	175
c	I	*AmiGatewayB*	*pRS300*	226
d	*AmiGatewayA*	*AmiGatewayB*	a + b + c	507

U PCR reakcijama za konstrukciju *amiRNA* konstrukata je korišćena izuzetno precizna *Phusion™ Hot Start II High-Fidelity DNA* polimeraza (*Thermo Scientific*, Voltam, SAD). Svaka reakciona smeša sadržala je 90 ng *pRS300* vektora, 0,4 μM prajmere i ostale komponente *Phusion* protokola u 50 μl reakcije (**Tabela 9.**). Program PCR amplifikacije dat je u **Tabeli 10**.

Tabela 9. Sastav reakcione smeše za *Phusion* PCR reakciju.

Komponenta	Zapremina (μl)
Phusion Green master miks	25
DMSO	1,5
Direktni prajmer (10 μM)	2
Reverzni prajmer (10 μM)	2
DNK matrica	1
Voda	18,5
Ukupno	50

Tabela 10. Program *Phusion* PCR reakcija za reakcije **a**, **b**, **c**, **d**.

Korak	Reakcija	T (°C)	Vreme	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija		98	30 s	1
Denaturacija		98	10 s	30
Hibridizacija	**a**, **c**, **d**	55		
	b	52	30 s	
Ekstenzija	**a**, **b**, **c**	72	15 s	
	d		40 s	
Finalna Ekstenzija		72	5 min	1
Čuvanje		4	∞	1

Tabela 11. Sekvence korišćenih prajmera u preklapajućim PCR reakcijama. U prajmerima za konstrukciju *CeNA1amiRNA* velika slova označavaju sekvence kojima se zamenjuje prirodna miRNK sekvenca *A. thaliana*, dok su mala slova specifična za vektor. * u *AmiGateway* prajmerima, mala slova označavaju *attB* mesta za rekombinaciju, dok su sekvence specifične za vektor predstavljene velikim slovima.

Naziv	Sekvence prajmera 5 → 3
CeNA1 ami1 I	gaTAGTCGCCTCCGTAGCGACTTctctcttttgtattcca
CeNA1 ami1 II	agAAGTCGCTACGGAGGCGACTAtcaaagagaatcaatga
CeNA1 ami1 III	agAAATCGCTACGGACGCGACTTtcacaggtcgtgatatg
CeNA1 ami1 IV	gaAAGTCGCGTCCGTAGCGATTTctacatatatattccta
CeNA1 ami2 I	gaTCCTACGATCGGTGCCTGCACctctcttttgtattcca
CeNA1 ami2 II	agGTGCAGGCACCGATCGTAGGAtcaaagagaatcaatga
CeNA1 ami2 III	agGTACAGGCACCGAACGTAGGTtcacaggtcgtgatatg
CeNA1 ami2 IV	gaACCTACGTTCGGTGCCTGTACctacatatatattccta
**AmiGatewayA*	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttgGAATTCCTGCAGCCCCAAAC
**AmiGatewayB*	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcGGCCGCTCTAGAACTAGTGG

3.3.5.3. Kolonijski PCR

Provera bakterijskih kolonija nakon transformacije urađena je metodom kolonijskog PCR-a. U sterilne mikrotube se najpre doda 7,3 µl sterilne vode, a zatim se se sterilnom čačkalicom pažljivo zagrebe kolonija sa površine petri kutije i ubaci u mikrotubu sa vodom. Nakon dodavanja bakterijske kolonije u mikrotubu, čačkalica je ubačena u sterilnu bočicu sa 5 ml tečnog medijuma, radi umnožavanja odabrane bakterijske kolonije preko noći. Koloniji su dodate ostale komponente reakcije - 0,5 µM prajmeri, kao i standardne komponente *Fermentas* protokola u ukupnoj zapremini od 12,5 µl (**Tabela 12.**). Za kolonijski PCR je korišćena termostabilna *Taq* polimeraza (*Thermo Scientific*, Voltam, SAD), a program amplifikacije i korišćeni prajmeri dati su u **Tabelama 13** i **14**.

Tabela 12. Komponente korišćene u kolonijskom PCR-u (*Fermentas* protokol).

Komponenta	Zapremina (µl)
10x *Taq* pufer sa $(NH_4)_2SO_4$	1,25
dNTP (10mM)	0,25
$MgCl_2$	1
Direktni prajmer (10 µM)	1,25
Reverzni prajmer (10 µM)	1,25
Taq	0,2
Voda + kolonija	7,3
Ukupno	12,5

Tabela 13. Program amplifikacije za kolonijski PCR. *52 ili 55 ˚C u zavisnosti od prajmera navedenih u **Tabeli 14.** ** 1-3 min u zavisnosti od dužine amplikona.

Korak	T (°C)	Vreme	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94	1 min	1
Denaturacija	94	30 s	30
Hibridizacija	*	30 s	
Ekstenzija	72	**	
Finalna Ekstenzija	72	5 min	1
Čuvanje	10	∞	1

Tabela 14. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju DNK iz bakterijskih kolonija. Prajmeri *AmiGatewayA* i *AmiGatewayB* su korišćeni i za preklapajuće PCR reakcije, a M13 prajmeri su korišćeni i za sekvenciranje. (F – direktni; R – reverzni).

Naziv	Sekvence prajmera 5 → 3	Ta (°C)
F - M13	GTAAAACGACGGCCAGT	52
R - M13	GGAAACAGCTATGACCATG	52
AmiGatewayA	ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttgGAATTCCTGCAGCCCCAAAC	55
AmiGatewayB	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcGGCCGCTCTAGAACTAGTGG	55

3.3.6. Elektroforeza na agaroznom gelu

Izolovana RNK i produkti PCR amplifikacija su provereni u pogledu kvaliteta elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Kako bi se sprečila degradacija RNK molekula, sistem za elektroforezu je prethodno tretiran 30 minuta 3% vodonik-peroksidom. RNK i produkti PCR reakcija su vizuelizovani pod UV svetlom pomoću UV transiluminatora (*QUANTUM ST4*-3000, *Vilber Lourmat*, *Marne-la-Vallée*, Francuska), a veličina fragmenata određena je pomoću DNK markera *O'GeneRuler* 100 bp *Plus DNA Ladder* (Fermentas, Voltam, SAD), *GeneRuler* 50 bp *DNA Ladder* (Fermentas, Voltam, SAD) ili *GeneRuler* 100 bp *DNA Ladder* (Fermentas, Voltam, SAD).

3.3.7. Izolacija DNK produkata iz agaroznog gela radi primene u eksperimentima kloniranja i pripreme standarda za RT-PCR reakcije

Amplifikovani DNK fragmenti odgovarajuće dužine su prečišćeni iz agaroznog gela pomoću *GeneJet extraction* kompleta (*Thermo Scientific*, Voltam, SAD) u skladu sa uputstvima proizvođača. Trake amplikona su vizuelizovane pod UV svetlom i isečene sterlinim skalpelom

(*Romed*, Vilnis, Holandija), nakon čega su ubačene u sterilne mikrotube (*Eppendorf*, Hamburg, Nemačka). Masa gela je izmerena, a u mikrotube je dodat pufer za vezivanje (engl. „*binding buffer*“) u odnosu 1:1 (*v:v*). Uzorci su potom inkubirani u vodenom kupatilu na temperaturi od 60 °C tokom 10 minuta ili dok se komadi gela nisu potpuno rastvorili. Nakon toga, uzorci su nalivani na kolonu za prečišćavanje i centrifugirani 1 minut na 12000 g. Usledilo je ispiranje sa 700 µl pufera za ispiranje (engl. „*wash buffer*“) i centrifugiranje 1 minut na 12000 g, a supernatant je odbačen. Prazna kolona centrifugirana je još jednom radi uklanjanja ostataka etanola. Kolone su postavljene u novi set mikrotuba i na centar kolone je dodato 50 µl pufera za eluiranje (engl. „*elution buffer*“). Nakon centrifugiranja na 12000 g u trajanju od jednog minuta, dobijena je prečišćena DNK. Koncentracija i kvalitet DNK su izmereni na *Nanodrop* aparatu (*N60 Nano-Photometer*®, *Implen GmbH*, Nemačka).

Rastvori za standardnu krivu za RT-qPCR reakcije su pripremljeni serijskim razblaživanjem DNK od 10^9 do 10^2 kopija.

Uzorci su čuvani na -20 °C do upotrebe.

3.3.8. Kvantitativni RT-PCR u realnom vremenu

Ekspresija gena je evaluirana metodom kvantitativnog RT-qPCR-a u realnom vremenu. Za RT-qPCR je korišćen *Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2x* komplet (*Thermo Fisher Scientific*, Voltam, SAD). Svaka reakcija je bila zapremine 10 µl i sadržala 1 µl cDNK i 5 µl *Maxima™* smeše, 3,7 µl vode i 0,3 µM odgovarajućih prajmera. Za svaki gen je korišćena negativna kontrola bez cDNK (engl. „*No Template Control*“, *NTC*), gde je umesto cDNK u bunarić dodato 1 µl H_2O. Za amplifikaciju ciljnih gena korišćena je mašina *QuantStudio® 3 Real-Time PCR System* (*Thermo Fisher Scientific*, Voltam, SAD). Parametri amplifikacije podrazumevali su početnu denaturaciju (95 °C/10 min), nakon čega je usledilo 40 ciklusa denaturacije (95 °C/15 s), hibridizacije (pri gen specifičnoj Ta/30 s) i ekstenzije (72 °C/30 s). Usledila je finalna ekstenzija na 72 °C tokom 10 min, a zatim je obavljena analiza krive topljenja.

Nivoi ekspresije gena su određeni kao Ct vrednosti (engl. „*Cycle threshold*“) koje predstavljaju broj potrebnih ciklusa da se detektuje fluorescentni signal. Specifičnost svih prajmera je potvrđena analizom kriva topljenja, dok je ekspresija gena analizirana relativnom kvantifikacijom. Standardi za standardnu krivu su napravljeni serijskim razblaživanjem prečišćenih PCR fragmenata u opsegu od 10^9 - 10^2 kopija (poglavlje 3.3.7.). Na osnovu vrednosti parametara standardne krive ustanovljeno je da se efikasnost RT-qPCR reakcija kretala u okviru optimalnih opsega 90–110%.

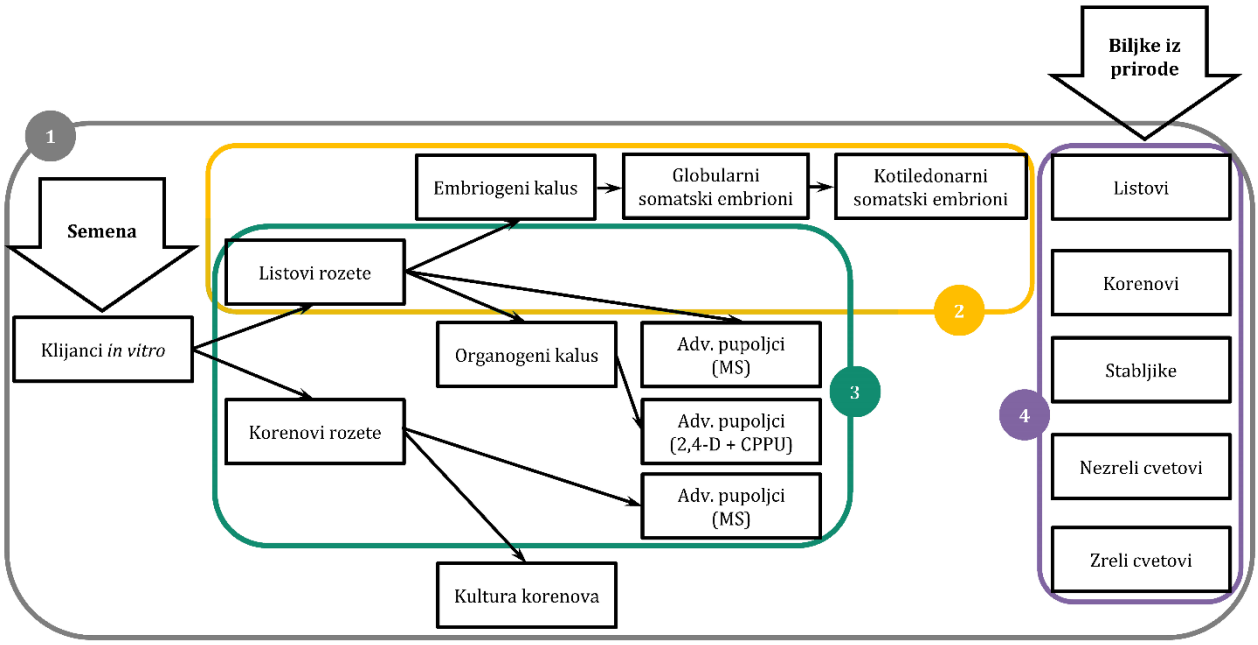
3.4. Evaluacija ekspresije odabranih genskih kandidata

3.4.1. Evaluacija stabilnosti ekspresije *housekeeping* gena i gena sa potencijalnom ulogom u SE u kolekciji tkiva kičice

Ekspresija odabranih DEG iz transkriptoma i *housekeeping* gena analizirana je u kolekciji 16 tkiva i delova biljaka kičice (**Tabela 1.**). Uzorci su prikupljeni po procedurama opisanim u poglavljima 3.1.1., 3.1.2. i 3.1.3.

Za procenu stabilnosti ekspresije *housekeeping* gena odabrano je 11 često korišćenih gena iz literature. Nivoi ekspresije gena određeni kao Ct vrednosti su dalje analizirani pomoću dva algoritamska pristupa - *geNorm* (besplatno dostupan na zahtev autorima, Vandesompele i sar. (2002)) i *NormFinder* (besplatno dostupan na zahtev autorima, Andersen i sar. (2004))

primenom *NormqPCR* paketa (Perkins i sar. 2012) u okviru R programskog jezika (R Core Team, 2016). *GeNorm* i *NormFinder* zahtevaju odgovarajući tip ulaznih podataka gde se Ct vrednosti konvertuju u $2^{-\Delta Ct}$ kako bi se minimizirala ukupna greška (Hellemans i sar. 2007, Wang i sar. 2017). Pre analize, uzorci su grupisani u četiri grupe prema poreklu biljnog materijala (**Slika 17.**). Prajmeri za odabrane gene su dati u **Tabeli 4**.



Slika 17. Uzorci tkiva i organa *C. erythraea* iz kulture *in vitro* i poreklom od biljaka iz prirode. Predstavljeno je 16 uzoraka iz različitih razvojnih faza u kojima je proverena stabilnost *housekeeping* gena. Od 16 uzoraka, pet potiče od biljaka iz prirode, dok je preostalih 11 dobijeno u kulturi tkiva. Brojevi označavaju grupe uzoraka: 1 - svi organi i faze razvića; 2 - uzorci koji predstavljaju proces somatske embriogeneze; 3 - uzorci koji predstavljaju proces razvića izdanaka (organogeneza); 4 - organi cvetalih biljaka iz prirode.

Ekspresija pretpostavljeno diferencijalno eksprimiranih gena iz transkriptoma kičice analizirana je relativnom kvantifikacijom ekspresije (log2 skala) metodom je $2^{-\Delta\Delta Ct}$ prema (Schmittgen i Livak 2008). Za normalizaciju ciljnih gena korišćeni su ribozomalni protein L2 (*RPL2*) i TATA vezujući protein 1 (*TBP1*), za koje je prethodno potvrđena konstitutivna ekspresija u tkivima različitog porekla u kičici. Tkivo lista je korišćeno za kalibraciju promena u ekspresiji gena drugih tkiva, a vrednosti su logaritamski transformisane i podvrgnute *ANOVA* testu praćenim *Tukey posthoc* testom kako bi se identifikovale statistički značajno različite vrednosti ($p < 0,05$). U slučajevima kada je ekspresija bila van opsega detekcije, za Ct vrednost je uzimana vrednost *y*-intersepta. Prajmeri za testirane gene su dati u **Tabeli 5**.

Za vizualizaciju varijacija u ekspresiji gena sa diferencijalnom ekspresijom primenjeno je hijerarhijsko klasterovanje uzoraka tkiva. Ova metoda klasterovanja se zasniva na Euklidovim distancama (vrednost 0 je potpuna identičnost, dok što je veći broj, to je veća razlika) konstruisanim na osnovu relativne promene ekspresija (log2 skala). Korišćena je *Ward*-ova metoda aglomeracije klastera (Ward 1963). Sličnost između parova genskih ekspresija je procenjena korišćenjem *Pairwise Spearman*-ovih korelacija, a tabela korelacija je prikazana u vidu toplotne mape pomoću R paketa *gplots* (Warnes i sar. 2019). Kolone i redovi toplotne mape su organizovani na osnovu hijerarhijske analize klastera zasnovane na matrici korelacionih distanci (1 – *corSp*). Za aglomeraciju klastera je korišćena metoda potpunog povezivanja (engl. „*complete linkage method*“). Optimalan broj klastera je određen *KGS* metodom (engl. „*Kelley-Gardner-Sutcliffe*“, (Kelley i sar. 1996)) i prikazan belim odstojanjima na toplotnoj mapi.

3.4.2. Evaluacija ekspresije odabranih gena iz transkriptoma u embriogenom tkivu genotipova sa varijabilnim kapacitetom za diferencijaciju

Ekspresija odabranih DEG u embriogenom tkivu genotipova sa niskim i visokim kapacitetom za diferencijaciju, evaluirana je relativnom kvantifikacijom ekspresije metodom $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Uzorci za analizu su prikupljeni po proceduri opisanoj u poglavlju 3.1.9. Ekspresija je normalizovana u odnosu na embriogeno tkivo genotipova sa niskim kapacitetom za diferencijaciju, a kao referentni geni korišćeni su *RPL2* i *TBP1*. Vrednosti Ct su logaritamski transformisane i podvrgnute *ANOVA* testu uz *Tukey posthoc* test kako bi se utvrdile statističke značajnosti ($p < 0,05$). Prajmeri za testirane gene su dati u **Tabeli 5**.

3.4.3. Evaluacija ekspresije *CeNA1* gena tokom ciklične SE

Ekspresija *CeNA1* gena iz transkriptoma kičice određena je relativnom kvantifikacijom ekspresije metodom $2^{-\Delta\Delta Ct}$ u embriogenom tkivu primarne i dva ciklusa sekundarne SE. Procedura za sakupljanje uzoraka embriogenog tkiva opisana je u poglavlju 3.1.6. Za normalizaciju ekspresije korišćeno je embriogeno tkivo primarne SE, a kao referentni geni upotrebljeni su *RPL2* i *TBP1*. Dobijene Ct vrednosti su logaritamski transformisane, a zatim analizirane *ANOVA* testom praćenim *Tukey posthoc* testom ($p < 0,05$). Prajmeri za testirane gene su navedeni u **Tabeli 5**.

3.5. Uslovi gajenja bakterijskih kultura i bakterijski sojevi

Korišćeni su sledeći bakterijski sojevi: *E. coli DB3.1*, *E. coli XL1 Blue* (*Stratagene*, La Džola, SAD) i *A. tumefaciens GV3101*. U *DB3.1* soju *E. coli* su umnožavani prazni *Gateway* vektori *pDONR221* i *pK7WG2D,1*, dok su u *E. coli XL-1 Blue* soju umnožavani *pRS300* vektor za sintezu *amiRNA* fragmenta i vektori *pDONR221* i *pK7WG2D,1 sa* ukloniranim insertima. Elektroporacijom su u soj *XL1 Blue* ubačeni ulazni i ekspresioni vektori, dok je u soj *GV3101 A. tumefaciens* elektroporacijom ubačen pripremljen binarni ekspresioni vektor za transformaciju kičice. Sojevi *E. coli DB3.1* i *XL1 Blue* su gajeni na *LB* podlogama, dok je soj *GV3101 A. tumefaciens* gajen na *YEB* podlozi. *SOC* podloga je korišćena za oporavak bakterija posle transformacije. Sastav korišćenih hranljivih podloga je naveden u **Tabeli 15**, dok su uslovi gajenja bakterijskih sojeva radi umnožavanja odgovarajućih vektora dati u **Tabeli 16**.

Bakterijski sojevi su čuvani na -80° C u vidu glicerol štoka, koji je sadržao 700 µl tečne bakterijske prekonoćne kulture i 300 µl 80% sterilnog glicerola, izmešanih na mešalici i zamrznutih u tečnom azotu pre stavljanja na -80° C.

Svi sojevi bakterija i vektori koji su upotrebljeni u procesu kloniranja dobijeni su sa Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković". Ekspresioni vektor *pK7WG2D,1* je nabavljen od kompanije *BioTech* (Gent, Belgija).

Tabela 15. Komponente hranljivih podloga za gajenje bakterijskih kultura. Sastav Tečnih *LB* i *YEB* podloga je isti, razlikuju se samo u odsustvu agara.

Komponente	**Podloga**		
	LB	*YEB*	*SOC*
Ekstrakt kvasca	5 gl^{-1}	1 gl^{-1}	5 gl^{-1}
Goveđi ekstrakt	-	5 gl^{-1}	-
Pepton	-	5 gl^{-1}	-
Tripton	10 gl^{-1}	-	20 gl^{-1}
NaCl	10 gl^{-1}	-	10 mM
Saharoza	-	5 gl^{-1}	-
$MgSO_4*7H_2O$	-	0,5 gl^{-1}	10 mM
$MgCl_2$	-	-	10 mM
KCl	-	-	2,5 mM
Glukoza	-	-	20 mM
Agar	1,5 gl^{-1}	1,5 gl^{-1}	-

Tabela 16. Bakterijski sojevi i uslovi gajenja bakterija u kojima su umnožavani odgovarajući vektori.

Bakterijski soj	**Vektor**	**Selektivni antibiotik**	**Podloga**	**T (°C)**	**Namena**
E. coli DB3.1	-	-	*LB*	37	umnožavanje *Gateway* vektora
E. coli DB3.1	*pDONR221*	kanamicin 100 mgl^{-1}	*LB*	37	*Gateway* donor vektor
E. coli DB3.1	*pK7WG2D,1*	spektinomicin 100 mgl^{-1}	*LB*	37	*Gateway* ciljni vektor
E. coli XL1 Blue	F plazmid	-	*LB*	37	*Stratagene*, kloniranje
E. coli XL1 Blue	*pRS300*	ampicilin 100 mgl^{-1}	*LB*	37	DNK matrica za sintezu *amiRNA*
A. tumefaciens GV3101	*pTiC58DT-DNA*	gentamicin	*YEB*	28	Transformacija biljaka

3.6. Dizajn i konstrukcija vektora za utišavanje gena

3.6.1. Dizajn *amiRNA* sekvence

Tehnologija veštačke mikroRNK (*amiRNA*) koristi put biogeneze miRNK za konstrukciju veštački dizajniranih malih RNK molekula dužine 21 nt, koji funkcionišu tako što specifično utišavaju pojedinačne ili više gena od interesa. *AmiRNA* sekvence su dizajnirane na osnovu sekvence transkripta *CeNA1* (TR23240|c0_g1_i1, sekvenca deponovana u repozitorijum arhiviranih digitalnih radova Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, RADaR, https://hdl.handle.net/21.15107/rcub_ibiss_6214), na platformi *WMD* (*Web MicroRNA Designer*, http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi?page=Home;project=stdwmd). Radi predikcije *off-target*-a, odnosno neželjenih sekvenci za koje bi se *amiRNA* sekvence mogle nespecifično vezati, *WMD* platforma zahteva označavanje neke od dostupnih baza sa anotiranim transkriptima. Budući da nije dostupna baza sa transkriptima kičice ili njoj filogenetski bliske biljke, sekvence su konstruisane koristeći sekvence iz svih 19 biblioteka

transkripata iz *Phytozome* kolekcije (Goodstein i sar. 2011). *WMD* dizajnira potencijalne *amiRNA* sekvence na osnovu reverznog komplementa ciljnog gena vodeći računa o nekoliko kriterijuma:

Broj i pozicija mismečeva:

- do jedan mismeč na poziciji 1-12 (idealno 0);
- do četiri mismeča na poziciji 13-21 (preferirano jedan ili dva);
- ΔG (slobodna vezujuća energija);
- Preferirani adenin na poziciji 10.

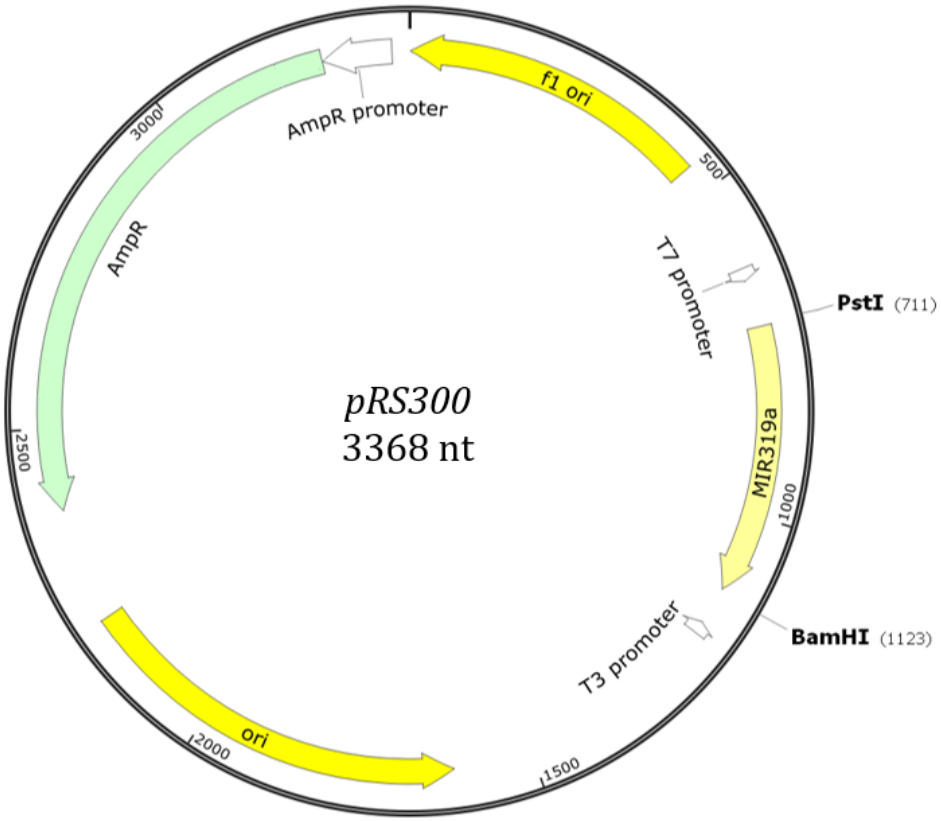
Objedinjenim *amiRNA* sekvencama je dalje manipulisano u *R* programu. Najpre su uklonjeni duplirani pogoci, a preostale jedinstvene *amiRNA* sekvence su blastovane sa sekvencama u transkriptomu kičice (vrednost e parametra e^{-41}) i izdvojene su sekvence sa manje od pet *BLAST* pogodaka. Zatim je na sekvencama iz transkriptoma blastovan najvažniji region *amiRNA* (2-12 nt) u cilju identifikacije neželjenih *off-target*-a, koji se u potpunosti (bez mismečeva) sparuju sa sekvencama u transkriptomu. Izbačene su sekvence sa više od dva *off-targeta*, a zatim je cela dužina preostalih *amiRNA* sekvenci upoređena sa sekvencama u transkriptomu i izdvojene su sekvence sa barem četiri mismeča. Na kraju, ove sekvence su upoređene sa TR23240|c0_g1_i1 i svim ostalim transkriptima kičice u cilju finalne provere specifičnosti odabranih *amiRNA* sekvenci.

In silico kloniranje *amiRNA* sekvenci u željene vektore obavljeno je pomoću alata *A plasmid Editor* (*ApE*, verzija 3.1.3) - besplatne, višenamenske platforme za vizuelizaciju, dizajn i prikaz biološki relevantnih DNK sekvenci (Davis i Jorgensen 2022).

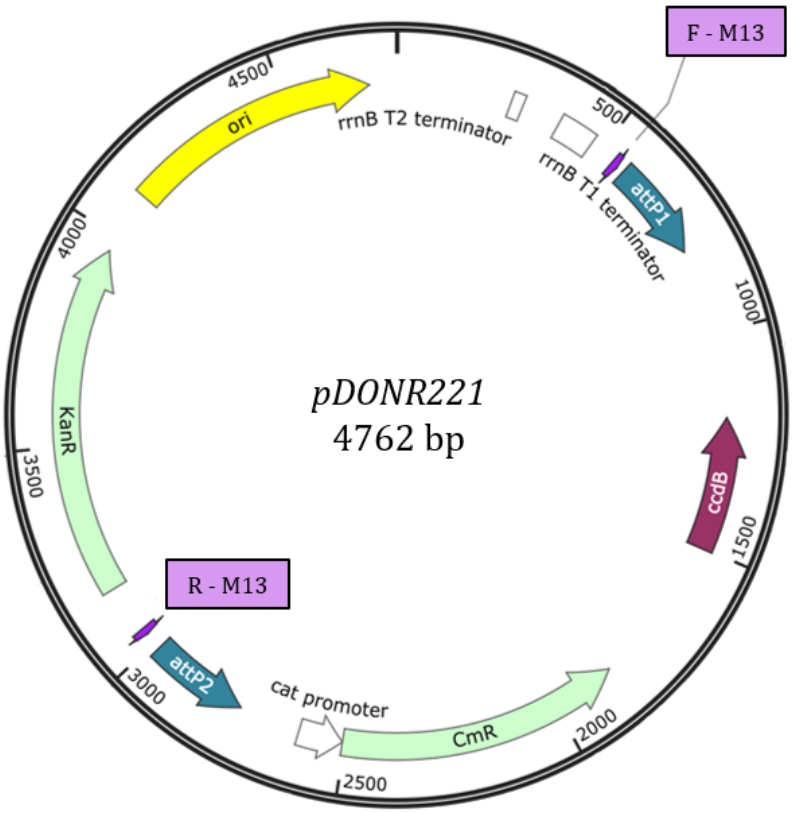
3.6.2. Gateway kloniranje

3.6.2.1. Vektori za kloniranje

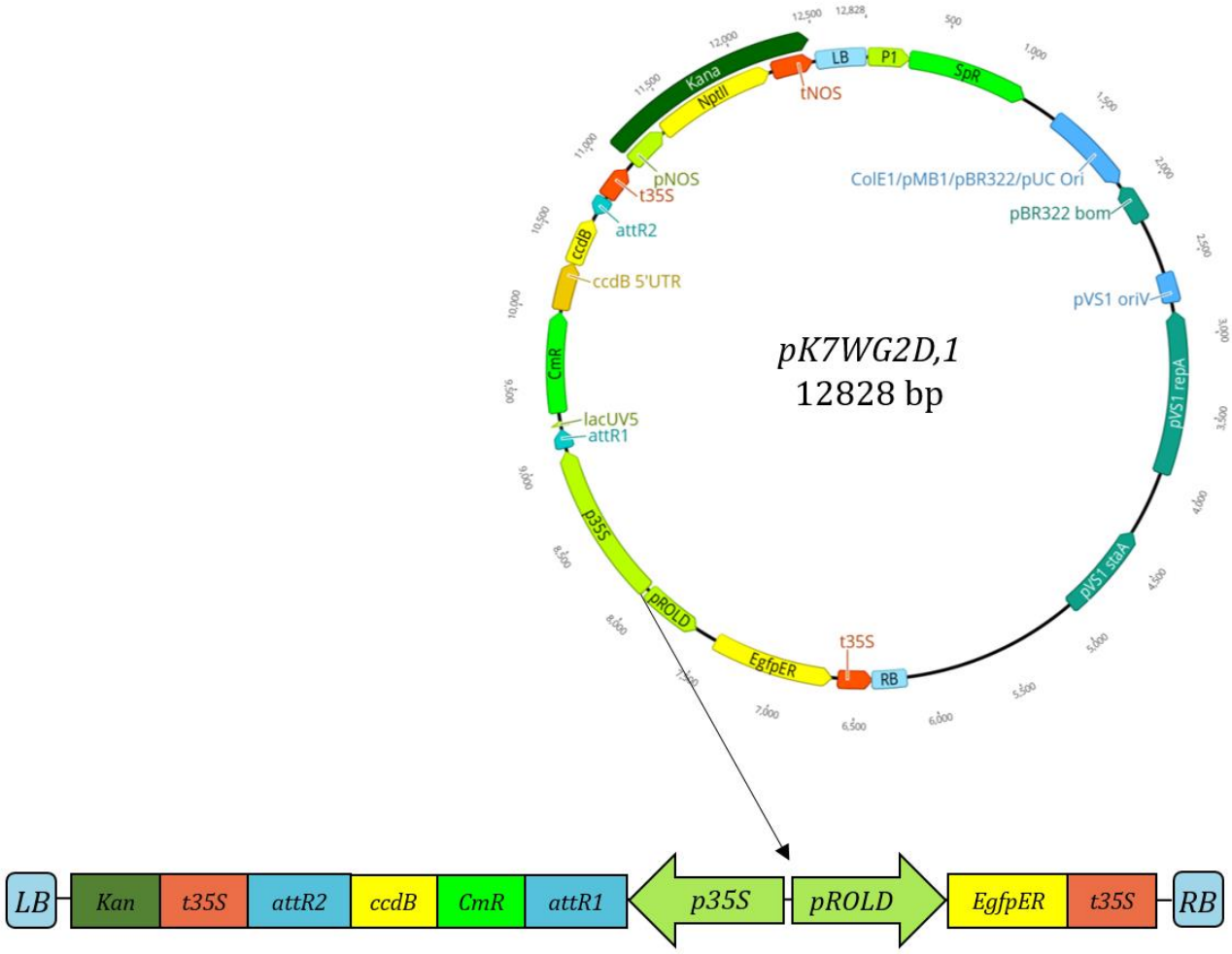
Za postupke kloniranja korišćeni su vektori *pRS300*, *pDONR221* i *pK7WG2D,1*, čije su ilustracije sa glavnim karakteristikama prikazane na **Slikama 18-20**.



Slika 18. Mapa *pRS300* (*Addgene*) vektora. Ovaj vektor dug 3368 nt sadrži miRNK poreklom iz *A. thaliana* u *sense*, *miR319a*, i *antisense*, *miR319a* * orijentaciji i korišćen je kao matrica za sintezu *amiRNA* fragmenata. Prirodne miRNK sekvence se serijom preklapajućih PCR reakcija zamenjuju dizajniranim *amiRNA* sekvencama, takođe u *sense* i *antisense* orijentaciji. Sadrži gen za rezistenciju na ampicilin u bakterijama.



Slika 19. Šematski prikaz praznog *pDONR221* vektora. Vektor dužine 4762 nt poseduje rezistenciju na kanamicin u bakterijama (*KanR*), a u regionu koji je oivičen *attP1* i *attP2* mestima i koji se iseca prilikom rekombinacije, nalazi se gen koji obezbeđuje rezistenciju na hloramfenikol (*CmR*) i *ccdB* gen. Ovaj region se amplifikuje M13 prajmerima, koji su takođe naznačeni (F – M13 – direktni; R – M13 – reverzni). Kloniranjem *amiRNA* fragmenta u *pDONR221* nastaje ulazni klon.



Slika 20. Mapa ciljnog binarnog vektora *pK7WG2D,1* koji se može koristiti za prekomernu ekspresiju gena. Detaljnije je prikazan T-DNK region vektora između levog i desnog graničnika (*LB* – levi-, *RB* – desni graničnik). U kaseti pod kontrolom promotora 35S nalaze se *attR* mesta, između kojih su gen za rezistenciju na hloramfenikol (*CmR*) i *ccdB* gen, a kaseta se završava terminatorom 35S. Između *attR* mesta se rekombinacijom ubacuje insert, a *ccdB* gen i *CmR* se isecaju iz vektora. Na taj način nastaje ekspresioni vektor za transformaciju biljaka. Nakon terminatora nalazi se kaseta koja obezbeđuje rezistenciju na kanamicin za selekciju u biljkama i koja se sastoji iz NOS promotora, gena za neomicin fosfotransferazu II (*NptII*) i NOS terminatora. U suprotnom smeru se pod kontrolom rolD promotora transkribuje kaseta reporterskog markera *GFP*. Za kodirajuću *GFP* sekvencu je fuzionisan signal za usmeravanje u endoplazmatični retikulum i terminator 35S. Za selekciju u bakterijama sadrži gen za spektinomicin rezistenciju. Preuzeto i modifikovano sa veb-stranice https://gatewayvectors.vib.be/collection/pk7wg2d.

3.6.2.2. *Gateway* BP reakcija

Nakon prečišćavanja iz agaraznog gela, produkti *Phusion PCR* reakcija (*amiRNA*) su klonirani u *pDONR221* vektor pomoću *Gateway® BP Clonase®* enzimskog miksa (*Invitrogen*, Voltam, SAD), što je rezultiralo stvaranju ulaznih klonova. Za reakciju je korišćena jednaka koncentracija *pDONR221* vektora i PCR produkta (50fM), a neophodna količina u ng je izračunata prema sledećoj formuli:

Količina DNK (ng) = koncentracija (fM) * veličina DNK (bp) * 660 * 10^{-6}.

Broj *µl* DNK koje treba upotrebiti u *BP* reakciji je izračunat na osnovu izmerene koncentracije DNK ($ngµl^{-1}$).

Najpre su DNK vektora i PCR produkti pomešani u odgovarajućoj količini (**Tabela 17.**) na sobnoj temperaturi i razblaženi u TE puferu (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM NaEDTA) do zapremine 8 µl. Potom je u svaki uzorak dodato 2 µl *BP Clonase* enzimskog miksa i reakcije su kratko vorteksovane. Usledila je inkubacija na 25 °C u trajanju od 1,5 h, nakon čega je rekombinacija zaustavljena dodavanjem 1 µl proteinaze K i inkubacijom 10 min na 37 °C. Postavljene su i pozitivna i negativna kontrola. Negativna kontrola je sadržala samo vektorsku DNK i TE pufer, dok je pozitivna kontrola bila obezbeđena u kompletu. Nakon *BP* reakcije, produkti su elektroporacijom ubačeni u kompetentne ćelije *E. coli* radi selekcije i umnožavanja.

Tabela 17. Komponente neophodne za *BP* reakcije. Reakcije su postavljene za *CeNA1 amiRNA 1*, *CeNA1 amiRNA 2*, pozitivnu i negativnu kontrolu.

Komponenta	**Zapremina (µl)**
CeNA1 amiRNA 1	0,54
pDONR221	0,56
TE pufer, pH 8,0	6,89
Međuzbir	8
BP Clonase® enzimski miks	2
Ukupno	10
CeNA1 amiRNA 2	0,49
pDONR221	0,56
TE pufer, pH 8,0	6,94
Međuzbir	8
BP Clonase® enzimski miks	2
Ukupno	10
Negativna kontrola	0
pDONR221	0,56
TE pufer, pH 8,0	9,44
Međuzbir	10
BP Clonase® enzimski miks	0
Ukupno	10
Pozitivna kontrola	0,92
pDONR221	0,56
TE pufer, pH 8,0	6,51
Međuzbir	8
BP Clonase® enzimski miks	2
Ukupno	10

3.6.2.3. *Gateway* LR reakcija

Nakon potvrde tačnosti kloniranja sekvenciranjem ulaznih klonova, insert je prebačen iz *pDONR207* vektora u ciljni vektor *pK7WG2D,1* pomoću kompleta *Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix* (*Invitrogen*, Voltam, SAD). Na taj način dobijeni su gotovi vektori, odnosno ekspresioni klonovi za transformaciju biljaka.

Za *LR* reakciju neophodno je 150 ng ulaznog klona i ciljnog vektora, što je preračunato u odnosu na koncentraciju DNK ($ng\mu l^{-1}$). Odgovarajuće količine DNK ulaznog klona i ciljnog vektora su na sobnoj temperaturi promešane i razblažene u TE puferu do zapremine 8 µl (**Tabela 18.**). Zatim je 2 µl odleđenog *LR Clonase®* enzimskog miksa dodato u svaku reakciju i reakcije su kratko vorteksovane. Usledila je inkubacija uzoraka 1,5 h na 25 °C. Radi zaustavljanja rekombinacije, u svaku reakciju je dodato 1 µl proteinaze K i uzorci su inkubirani na 37 °C u trajanju od 10 min. Kao negativna kontrola postavljena je reakcija bez DNK ulaznog klona i *LR* enzimskog miksa, već samo sa DNK ciljnog, *pK7WG2D,1* vektora. Produkti su elektroporacijom ubačeni u kompetentne ćelije *E. coli XL1 Blue* (*Stratagene*, La Džola, SAD).

Tabela 18. Komponente *LR* reakcije. Reakcije su postavljene za potvrđene ispravno klonirane ulazne *pDONR221 CeNA1 amiRNA* vektore i negativnu kontrolu bez DNK *pDONR221* vektora.

Komponenta	**Zapremina (µl)**
pDONR221 CeNA1 amiRNA 1	0,61
pK7WG2D,1	0,4
TE pufer, pH 8,0	6,99
Međuzbir	8
LR Clonase® enzimski miks	2
Ukupno	10
pDONR221 CeNA1 amiRNA 2	0,67
pK7WG2D,1	0,4
TE pufer, pH 8,0	6,93
Međuzbir	8
LR Clonase® enzimski miks	2
Ukupno	10
Negativna kontrola	0
pK7WG2D,1	0,4
TE pufer, pH 8,0	9,6
Međuzbir	10
LR Clonase® enzimski miks	0
Ukupno	10

3.6.3. Sekvenciranje plazmidne DNK radi provere tačnosti kloniranja

Nakon selekcije i umnožavanja produkata *BP* reakcije, plazmidna DNK je poslata na sekvenciranje kompaniji *Macrogen Europe* (https://macrogen-europe.com/, Amsterdam, Holandija) radi provere tačnosti kloniranja. Kao direktni prajmer korišćen je M13, dok je kao reverzni prajmer odabran T7 *promoter*, dostupan na listi univerzalnih prajmera na *Macrogen* veb-sajtu (**Tabela 19.**). Pri analizi sekvenci proveravana je ispravnost kloniranja *amiRNA* sekvenci, kičme vektora i *attL* rekombinacionih mesta. Metoda sekvenciranja je bila Sangerovo standard sekvenciranje sa oba prajmera u direktnoj i reverznoj orijentaciji.

Tabela 19. Sekvence prajmera korišćenih za sekvenciranje produkata BP reakcije kloniranja. F – direktni; R – reverzni prajmer.

Naziv	**Sekvence prajmera 5 → 3**
F - M13	GTAAAACGACGGCCAGT
R - T7 *promoter*	TAATACGACTCACTATAGGG

3.6.4. Pravljenje kompetentnih bakterijskih ćelija

Za umnožavanje praznih plazmida (bez inserta) *pDONR221* i *pK7WG2D,1* su korišćene elektro-kompetentne ćelije *DB 3.1 E. coli*., a elektro-kompetentni soj *XL-1 Blue E. coli* je korišćen za umnožavanje plazmida *pRS300*. Elektro-kompetentne ćelije soja *GV3101 A. tumefaciens* su transformisane ciljnim vektorima koji su sadržali *amiRNA* inserte u cilju dobijanja gotovih sojeva za transformaciju biljaka.

Elektro-kompetentne ćelije su napravljene inokulacijom jedne bakterijske kolonije u 10 ml tečnog medijuma prema protokolu opisanom u Bogdanović (2015). Bakterijske kulture su gajene na optimalnoj temperaturi za dati soj (28 °C za agrobakterije ili 37 °C za *E. coli*), a optička gustina (OD600) je podešena na 0,5, vodeći računa da bakterije budu u optimalnoj fazi rasta. Pripremljene ćelije su alikvotirane po 30 µl u sterilne mikrotube od 1,5 ml, zatim zamrznute u tečnom azotu i čuvane na temperaturi od -80°C do upotrebe.

3.6.5. Transformacija bakterija elektroporacijom

Elektroporacijom su transformisane elektro-kompetentne ćelije *E. coli* i *A. tumefaciens*. Alikvoti kompetentnih ćelija su uzeti sa -80 °C i sve vreme držani na ledu kako bi se sporo otapali. U 30 µl alikvota ćelija je dodato 1 µl DNK vektora i lagano promešano vrhom nastavka automatske pipete. Smeša je inkubirana pola sata na ledu, nakon čega je prebačena u sterilne kivete za elektroporaciju od 2 mm (*Sarstedt*, Nimbreht, Nemačka) sa kojih je ubrusom odstranjen višak tečnosti. Elektroporacija je urađena na elektroporatoru *Eporator*® (*Eppendorf*, Hamburg, Nemačka), sa podešenom voltažom na 2500 V. Nakon elektroporacije, u kivete je dodato 1 ml *SOC* tečnog medijuma, kratko promešano i prebačeno u sterilne tube sa zaobljenim dnom (engl. „*loose-cap tubes*"), koje su 1 h mešane na odgovarajućoj temperaturi (28° ili 37° C). Suspenzija je zatim prebačena u sterilne mikrotube od 2 ml i centrifugirana 5 min na 3500 rpm. Odbačeno je oko 900 µl supernatanta, talog je resuspendovan u ostatku tečnosti, od čega je 20-100 µl raširenо po odgovarajućoj podlozi na petri kutiji. Peti kutije su inkubirane preko noći na adekvatnoj temperaturi za dati bakterijski soj.

3.7. *In silico* analiza genskih i proteinskih homologa CeNA1

3.7.1. Sekvence gena i proteina CeNA1

U toku trajanja izrade ove disertacije, sekvenciran je genom *C. erythraea* Rafn. iz mladih listova diploidnog varijeteta biljaka gajenih *in vitro.* Sekvenciranje je obavila kompanija *DNA LINK* (Seul, Južna Koreja, https://www.dnalinkseqlab.com/) na *PacBio Sequel* platformi (*Pacific Biosciences*, Menlo Park, SAD), a sekvence su anotirane pomoću softvera *MAKER* (Cantarel i sar. 2008) i *Blast2GO* (Conesa i sar. 2005, Conesa i Götz 2008). Mapiranjem transkripta *CeNA1* (TR23240|c0_g1_i1) na genom, dobijene su sekvence CeNA1 gena. Procenat sličnosti između nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci, koje su prediktovane na osnovu sekvence transkripta TR23240|c0_g1_i1 i *CeNA1* gena, određen je pomoću *UniProt Align* alata (Consortium 2022).

Sekvence gena i proteina CeNA1 su dostupne u repozitorijumu RADaR (https://hdl.handle.net/21.15107/rcub_ibiss_6214).

3.7.2. *In silico* predikcija strukture gena *CeNA1*, analiza promotora i vezivnih mesta za transkripcione faktore

Za determinaciju koordinata egzona, introna i netranslirajućih regiona *CeNA1* gena, korišćen je softver *GSDS* (http://gsds.gao-lab.org/, Hu i sar. (2015)). *GSDS* predviđa mogući raspored egzona, introna i netranslirajućih sekvenci na osnovu *in silico* poređenja kodirajuće sekvence transkripta sa genskim sekvencama.

Promotori u *CeNA1* genima su analizirani u regionima od 1000 nukleotida uzvodno do 100 nukleotida nizvodno od mesta početka transkripcije. Promotorske sekvence (deponovano u RADaR, https://hdl.handle.net/21.15107/rcub_ibiss_6214) su izdvojene iz genoma kičice korišćenjem *Biostrings*, *rtracklayer* i *BSgenome* alata za manipulisanje genskim sekvencama u okviru R paketa *BiocManager* (Marini i sar. 2020). Vezivna mesta i familije TF-a koji se mogu vezati za specifične motive u *CeNA1* promotorima identifikovani su *in silico* pomoću softvera *PlantRegMap* (http://plantregmap.gao-lab.org/binding_site_prediction.php, (Tian i sar. 2019)). Lista transkripcionih faktora preuzeta je iz biljke *Coffea canephora*, za koju je utvrđeno da je najsličnija kičici na osnovu filogenetske analize na veb-sajtu *Angiosperm Phylogeny* (verzija 14, http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/, Stevens (2001)). Zadata vrednost praga za parametar *p* je iznosila 10^{-5}, a za dalju obradu podataka su izabrana mesta za vezivanja TF-a čija je *q* vrednost manja od 0,05, prema Storey i Tibshirani (2003). Transkripcionim faktorima su dodeljene *GO* anotacije, koje su preuzete iz baze biljnih TF *PlantTFDB* (verzija 5.0, http://planttfdb.gao-lab.org/, Jin i sar. (2016)) kako bi se opisali biološki procesi u kojima učestvuju.

3.7.3. *In silico* karakterizacija CeNA1 proteina kičice

Analizom proteina CeNA1 kombinacijom različitih softvera identifikovani su tranzitni peptidi na N-terminusu, potencijalna unutarćelijska lokalizacija proteina i vezanost za ćelijsku membranu. Alat *TargetP2* (verzija 2.0, https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0, (Armenteros i sar. 2019)) je korišćen za predikciju N-tranzitnog peptida, a alat *Cello* (verzija 2.0, http://cello.life.nctu.edu.tw/, Yu i sar. (2006)) za predikciju unutarćelijske lokalizacije. Za predviđanje N-tranzitnog peptida i unutarćelijske lokalizacije korišćen je takođe alat *DeepLoc* (verzija 1.0, https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepLoc-1.0, Almagro Armenteros i sar. (2017)), dok je za predviđanje lokalizacije proteina i njihovu vezanost za membranu korišćen softver *Light Attention* (*LA*, https://embed.protein.properties/, Stärk i sar. (2021)).

Trodimenzionalna (3D) tercijarna struktura proteina CeNA1 je prediktovana pomoću softvera *AlphaFold* (Jumper i sar. 2021) i vizuelizovana pomoću *UCSF ChimeraX* (verzija 1.5, Pettersen i sar. (2021)).

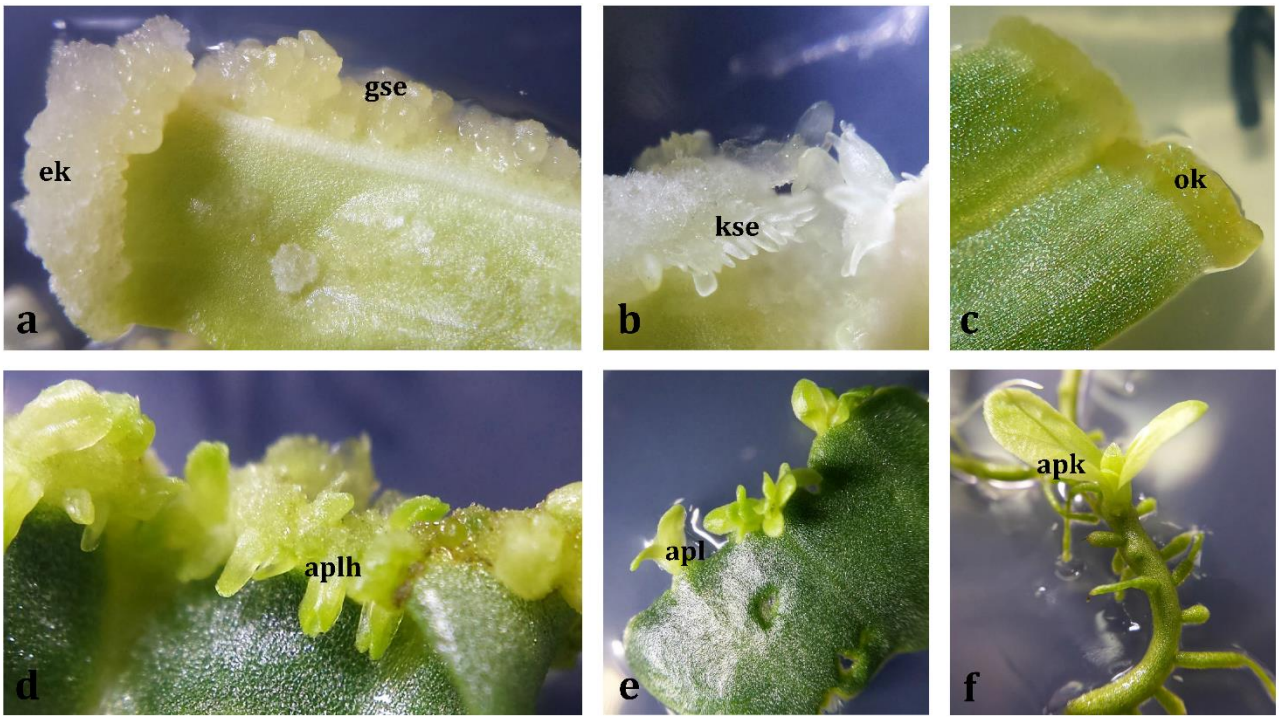
4. Rezultati

4.1. Uspostavljanje kolekcije tkiva i organa kičice

Kolekciju različitih razvojnih faza kičice čini 16 organa i tkiva biljaka gajenih *in vitro* i iz prirode. Kolekcija obuhvata uzorke organa biljaka iz prirode (**pcl**, **pck**, **pcs**, **pzc**, **pnc**, **Slika 21.**), organa biljaka gajenih *in vitro* na podlozi bez RRB na svetlu (**rl**, **rk**, **kl**, **kk**, **Slika 22.**), organogenih tkiva indukovanih na svetlu na MS podlozi sa dodatkom 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU (**ok**, **aplh**, **apl**, **apk**, **Slika 23.**) i embriogenih tkiva indukovanih nakon četiri nedelje gajenja u mraku na MS podlozi sa 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU (**ek**, **gse** i **kse**, **Slika 23.**).

Slika 21. Biljke *C. erythraea* iz prirode. (a) Cvetala biljka; (b) uzorci zrelih (otvorenih) cvetova; (c) uzorci nezrelih (zatvorenih) cvetova. **pzc** - zreli cvetovi, **pnc** - nezreli cvetovi.

Slika 22. (a) Tri nedelje stari klijanci *C. erythraea in vitro*; (b) biljka u fazi rozete; (c) kultura korenova.



Slika 23. Indukcija SE i organogeneze kod *Centaurium erythraea* Rafn. (a) Embriogeni kalus i globularni somatski embrioni formirani na MS podlozi sa 2,4-D i CPPU, u mraku; (b) kotiledonarni somatski embrioni formirani na MS podlozi sa 2,4-D i CPPU, u mraku; (c) organogeni kalus na MS podlozi sa 2,4-D i CPPU, na svetlu; (d) adventivni pupoljci na 2,4-D i CPPU, na svetlu; (e) adventivni pupoljci na podlozi bez regulatora rastenja, na svetlu; (f) adventivni pupoljci sa korena na podlozi bez regulatora rastenja, na svetlu. **ek** - embriogeni kalus; **gse** - globularni somatski embrion, **kse** - kotiledonarni somatski embrion, **ok** - organogeni kalus, **apl** - spontano dobijeni adventivni pupoljak sa lista, **apk** - spontano dobijeni adventivni pupoljak sa korena, **aplh** - adventivni pupoljak sa lista dobijen na podlozi sa 2,4-D i CPPU.

4.2. Sekvenciranje transkriptoma *C. erythraea* Rafn.

NGS tehnologija predstavlja moćno sredstvo koje se široko koristi za pribavljanje setova transkripata iz biljaka koje nisu model-sistemi u odsustvu referentnog genoma. U cilju *de novo* sastavljanja transkriptoma *C. erythraea*, RNK visokog kvaliteta je izolovana i sekvencirana iz šest uzoraka tkiva iz kolekcije tkiva i organa kičice: **rl**, **rk**, **ek**, **gse**, **kse** i **aplh** (**Tabela 1.**, **Slika 22.**, **Slika 23.**).

4.2.1. Karakteristike transkriptoma

Kao rezultat sekvenciranja generisano je preko 30 miliona „sirovih“ očitavanja sa oba kraja fragmenata po uzorku (**Tabela 20.**). Sva „sirova“ očitavanja su prošla kroz proces filtriranja kako bi se uklonile nepouzdane, adapterske i sekvence slabijeg kvaliteta, rezultirajući u ukupno ~200 miliona „čistih“ očitavanja (**Tabela 21.**). Ustanovljeno je da su očitavanja bila visokog kvaliteta, sa više od 92,3% baza sa baznom preciznošću 99,9 (engl. „*Phred Quality Score*“ $Q \geq Q30$) i sa srednjom vrednošću kvaliteta od ~ 36 (**Tabela 20.**). Očitavanja visokog kvaliteta iz svih uzoraka su objedinjena i upotrebljena kao ulazni podaci za *de novo* sastavljanje transkriptoma pomoću *Trinity* tehnologije (Grabherr i sar. 2011). Budući da u vreme sprovođenja eksperimenta nisu bili dostupni sekvencirani genomi, kako iz roda *Centaurium*, tako ni iz bilo koje srodne vrste iz porodice Gentianaceae koji bi se mogli koristiti kao referenca, sastavljanje transkriptoma je obavljeno *de novo*.

Tabela 20. Kvalitet dobijenih očitavanja nakon sekvenciranja RNK u šest uzoraka tkiva *C. erythraea* Rafn. „Sirova“ očitavanja - pre uklanjanja očitavanja slabijeg kvaliteta; „čista“ očitavanja - nakon uklanjanja očitavanja slabijeg kvaliteta; *Q*30 - procenat baza sa *Phred* kvalitativnim skorom *Q* > 30; srednja vrednost *Q* - srednja vrednost *Phred* kvalitativnog skora.

Uzorci tkiva		**„Sirova“ očitavanja**	**„Čista“ očitavanja**	***Q*30, %**	**Srednja vrednost *Q***
Listovi rozete	**rl**	32450730	32434586	92,5	35,96
Korenovi rozete	**rk**	29258318	29235284	92,34	35,91
Embriogeni kalus	**ek**	32465426	32451590	93,44	36,24
Globularni somatski embrioni	**gse**	33479884	33472692	93,37	36,21
Kotiledonarni somatski embrioni	**kse**	34914710	34896604	93,57	36,2
Adventivni pupoljci sa lista	**aplh**	37055534	37037786	93,11	36,14

Tabela 21. Opšte odlike *de novo* sastavljenog transkriptoma *C. erythraea* Rafn. N50 - dužina najkraćeg kontiga na 50% ukupne dužine transkriptoma.

Opšte odlike transkriptoma *C. erythraea* Rafn.	
„Sirova“ očitavanja pre uklanjanja očitavanja slabijeg kvaliteta	199624602
„Čista“ očitavanja nakon uklanjanja očitavanja slabijeg kvaliteta	199528542
Ukupno *Trinity* transkripata	160839
Ukupno *Trinity* „unigena “	105726
Veličina „sirovo“ sastavljenog transkriptoma	142 Mb
Oznake transkripata	74116
Transkripti sa predviđenom proteinskom sekvencom	127867
Prosečna dužina kontiga	882 bp
Medijana dužine kontiga	509 bp
N50	1080 bp
%GC	41,33

Sastavljeni „sirovi“ transkriptom kičice je bio veličine 142 Mb i sadržao 160839 transkripata. Ovi transkripti su grupisani u 105726 *Trinity* gena ili „unigena” prosečne dužine 882 bp sa GC sadržajem 41,33% (**Tabela 21.**). Vrednost N50 od 1080 bp ukazuje na to da najmanje polovina svih transkripata ima minimalnu dužinu 1080 bp (Miller i sar. 2010).

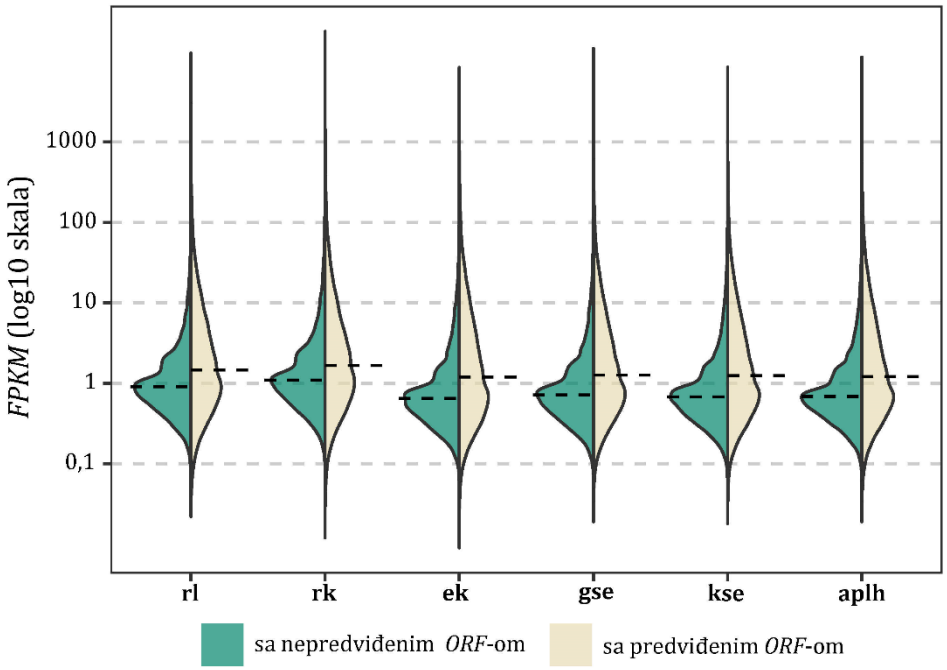
Biološki najkorektniji način za procenu kvaliteta transkriptoma je *BUSCO* analiza pokrivenosti transkriptoma (Simão i sar. 2015). Set od 430 *BUSCO* gena specifičnih za biljke je poravnat sa transkriptomom kičice pomoću *BUSCO* v3. Rezultati *BUSCO* analize (**Tabela 22.**) su pokazali da su u transkriptomu kičice pronađeni svi osim dva *BUSCO* gena, pri čemu je 94,9% poravnatih *BUSCO* gena bilo kompletno.

Tabela 22. *BUSCO* evaluacija pokrivenosti transkriptoma kičice.

***BUSCO* analiza**	**broj**	**%**
Testirani *BUSCO* geni	430	
Kompletni *BUSCO* geni	408	94,9
Kompletni *BUSCO* geni u jednoj kopiji	177	41,2
Kompletni duplirani *BUSCO* geni	231	53,7
Fragmentisani *BUSCO* geni	20	4,7
Nedostajući *BUSCO* geni	2	0,4

4.2.2. Kvantifikacija zastupljenosti transkripata

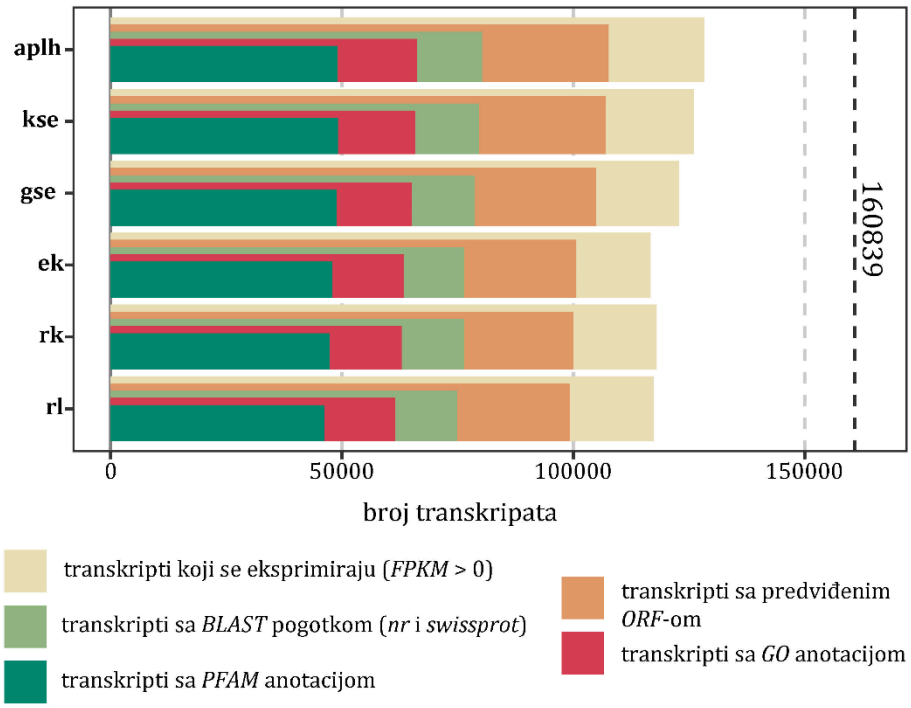
Distribucija nivoa ekspresije sastavljenih transkripata u šest transkriptoma *C. erythraea* prikazana na **Slici 24.** pokazuje da transkripti imaju uporedive distribucije *FPKM* profila. Uzorak **rk** ima nešto veće srednje vrednosti *FPKM* za transkripte sa i bez predviđenih *ORF*-ova (1,67 i 1,1 *FPKM*, redom). Takođe, jasno je da velika većina (97,5–98,3%, u zavisnosti od tkiva) eksprimiranih transkripata spada u raspon od 0,1–100 *FPKM*. Transkripti sa predviđenim *ORF*-om imaju veće *FPKM* vrednosti u poređenju sa transkriptima bez predvidjenog *ORF*-a iz istog transkriptoma (**Slika 24.**).



Slika 24. Raspodela nivoa ekspresije transkripata sa i bez predviđenog *ORF*-a u šest transkriptoma kičice. Isprekidane linije označavaju medijane *FPKM* vrednosti.

4.2.3. Funkcionalna anotacija transkriptoma

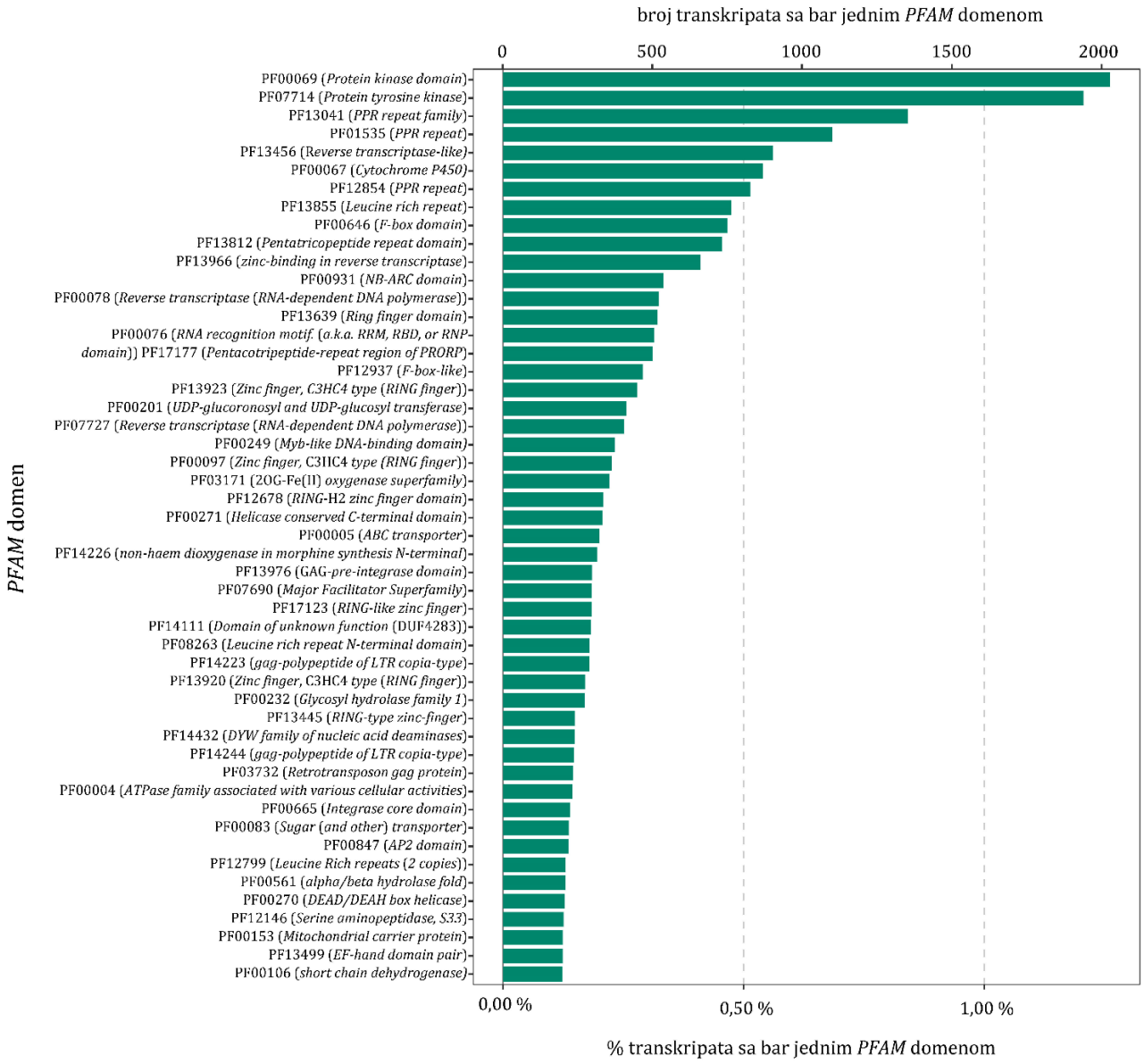
Transkripti kičice su podvrgnuti poravnanju sa *NCBI nt* bazom podataka pomoću *BLASTn* algoritma, dok je predviđeni proteom anotiran mapiranjem prema *Swissprot* (*NCBI* nr), *KOG* i *PFAM30* bazama podataka. Broj funkcionalno anotiranih transkripata u svakom uzorku je sažeto prikazan na **Slici 25**. Od 160839 sastavljenih *Trinity* transkripata, njih 94701 (ili 58,8%) je identifikovano u najmanje jednoj bazi podataka (sa E-vrednošću od 10^{-5}). Takođe, 31409 (ili 19,5%) transkripata je pronađeno u svim bazama podataka, dok je 66138 (ili 41,2%) ostalo neidentifikovano.



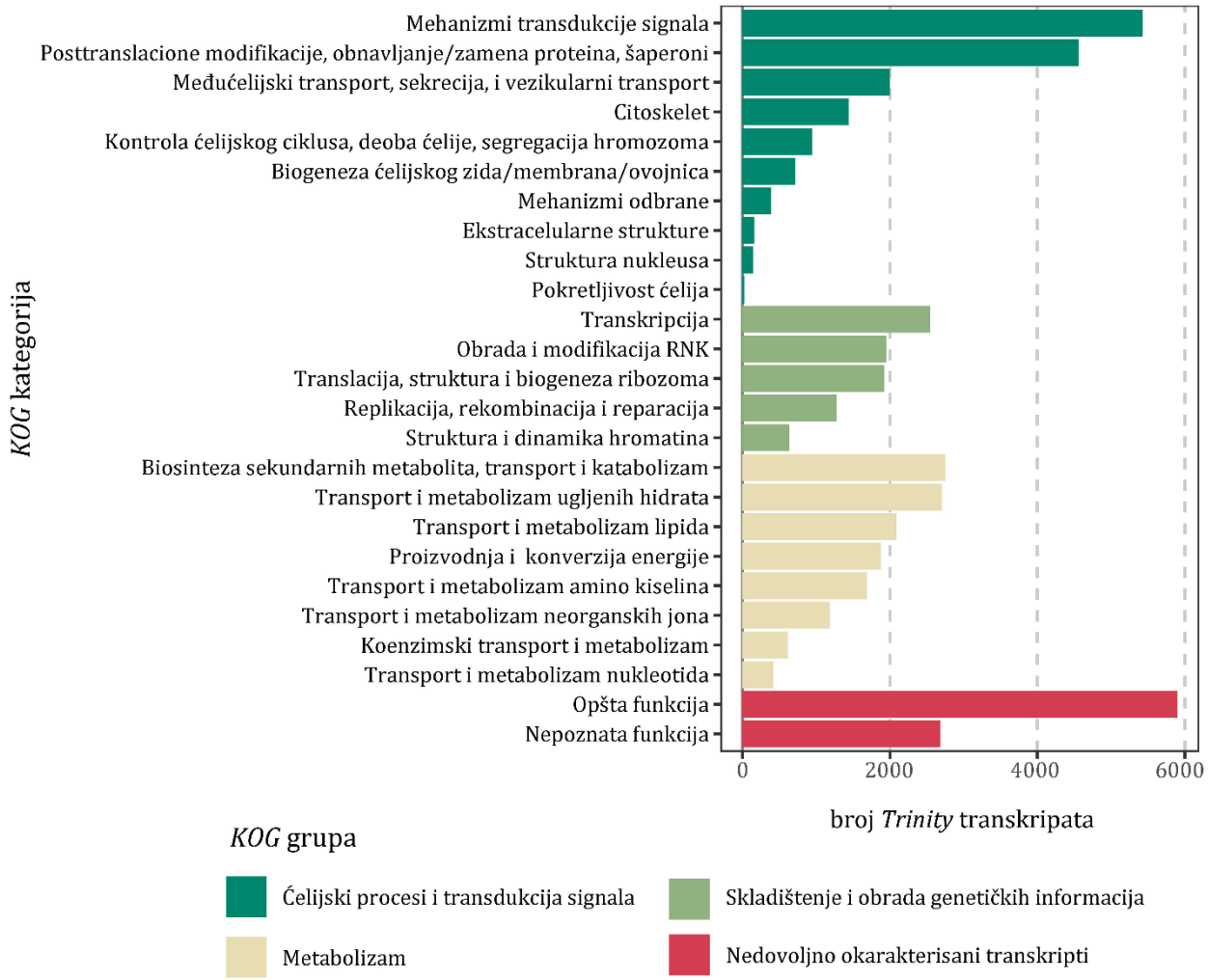
Slika 25. Pregled anotacije transkripata u uzorcima šest sekvenciranih tkiva. Naveden je broj eksprimiranih transkripata u svakom uzorku, kao i broj transkripata sa predviđenim *ORF*-ovima, *BLAST* pogocima i *PFAM* i *GO* anotacijom.

Na **Slici 26.** prikazana je distribucija *PFAM* domena u proteomu kičice, uzimajući u obzir podudaranja domena sa E vrednošću < 10^{-5}. Najzastupljeniji domeni bili su protein kinazni domeni (PF00069 i PF07714) i i domeni koji sadrže pentatrikopeptidna ponavljanja (engl. „*Pentatricopeptide repeats*“, PPR), kao što su PPR, PF13041, PF01535, PF12854, PF13812, PF17177. Takođe, primećeni su strukturni motivi ponavljanja bogatih leucinom (engl. „*Leucine Rich Repeat*“, LLR), kao što su PF13855, PF12799, PF13516, PF08263.

„Unigeni” su dalje anotirani i klasifikovani mapiranjem na *KOG* proteinsku bazu podataka. *KOG* baza podataka je generisana upoređivanjem predviđenih i poznatih proteina u svim sekvenciranim genomima eukariota kako bi se identifikovali setovi ortologa. Ukupno 38925 transkripata sa 55401 predviđenih *ORF*-ova je mapirano na *KOG* ortologe sa E ≤ 10^{-5} graničnom vrednošću na bazi homologije sekvenci. Transkripti su klasifikovani u 25 kategorija koje spadaju u četiri osnovne funkcionalne grupe: ćelijski procesi i transdukcija signala, metabolizam, skladištenje i obrada genetičkih informacija i nedovoljno okarakterisani transkripti (**Slika 27.**). Najveći broj transkripata je svrstan u kategoriju „Opšta funkcija” (5898 transkripata ili 3,67% svih transkripata), zatim slede „Mehanizmi transdukcije signala” (5421 ili 3,37% transkripata) i „Posttranslaciona modifikacija, obnavljanje/zamena proteina, šaperoni” (4562 ili 2,84%), dok samo 22 transkripta spada u kategoriju „Pokretljivost ćelija“.

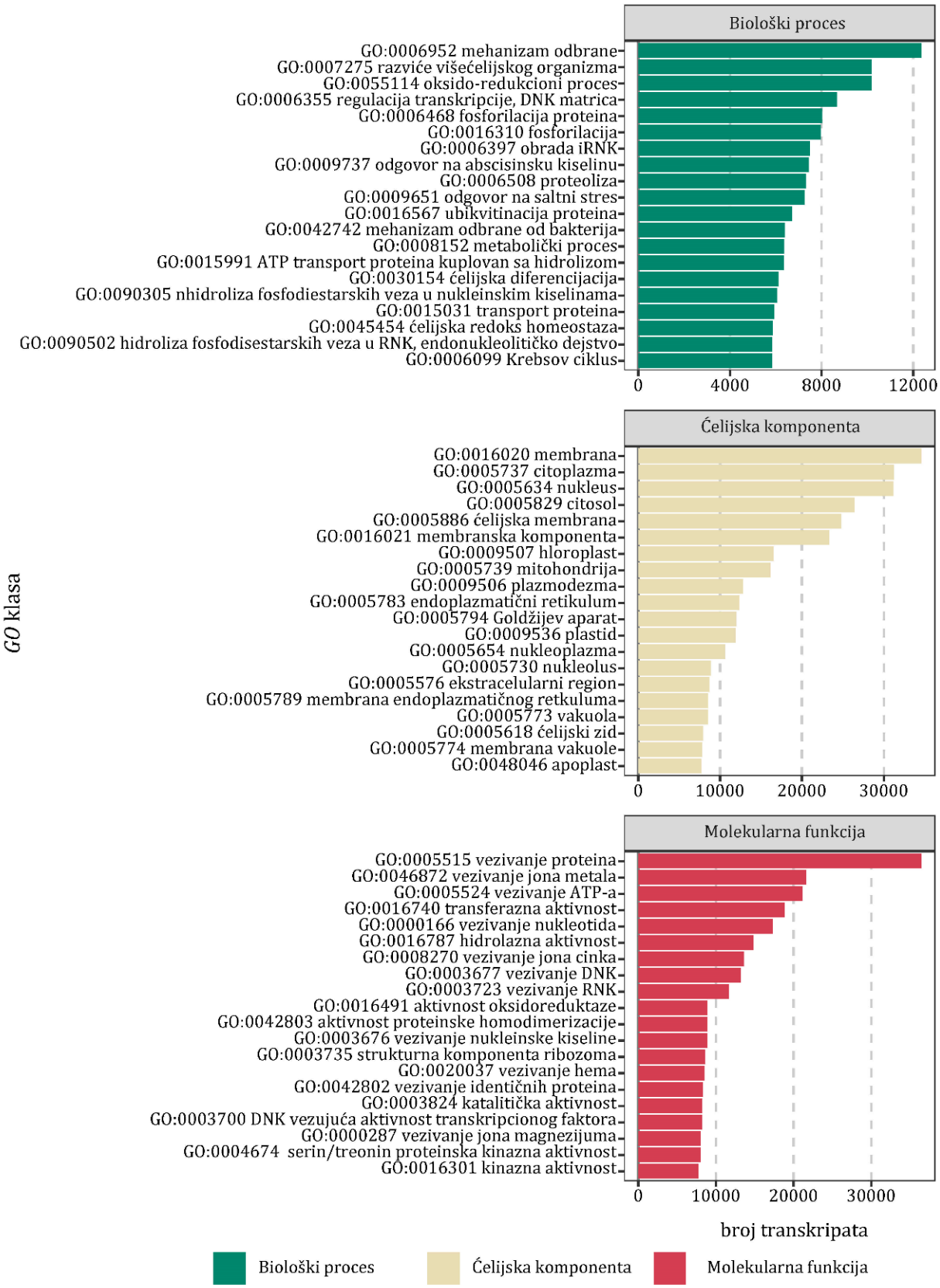


Slika 26. Raspodela *PFAM* domena u proteomu kičice ($E < 10^{-5}$).



Slika 27. Raspodela transkripata kičice u 25 funkcionalnih *KOG* kategorija. Kategorije pripadaju određenoj *KOG* grupi (ćelijski procesi i transdukcija signala, metabolizam, skladištenje i obrada genetičkih informacija ili nedovoljno okarakterisani transkripti).

Funkcionalna anotacija transkriptoma je kompletirana dodeljivanjem *GO* termina transkriptima pomoću *Blast2GO* i *Pfam2GO* alata, tako da budu zadovoljeni uslovi pretrage po sličnosti i pretrage po domenu. Ukupno 75485 transkripata je dobilo *GO* termine, pri čemu je više od 60000 transkripata iz svakog od šest uzoraka dobilo *GO* anotaciju (**Slika 25.**). Od ukupno 160839 transkripata, 72179 je povezano sa „biološkim procesom" (*GO*: 0008150), 72597 sa „molekularnom funkcijom" (*GO*: 0003674) i 70795 sa „ćelijskom komponentom" (*GO*: 0005575), sa ukupno 23021 *GO* termina. Najzastupljeniji *GO* termini u anotiranom transkriptomu kičice su „vezivanje za proteine", „membrana", „citoplazma" i „nukleus" sa više od 30000 transkripata svaki (**Slika 28.**).

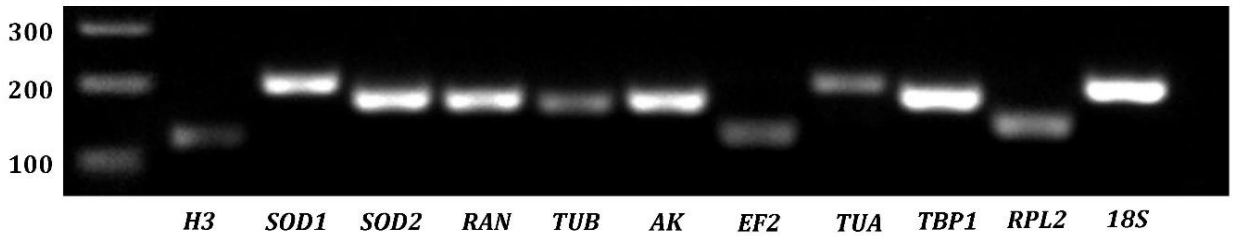


Slika 28. *GO* klase koje pripadaju grupi bioloških procesa, ćelijskim komponentama ili molekularnoj funkciji. Za svaku grupu je prikazano najzastupljenijih 20 *GO* klasa.

4.3. Izbor adekvatnih referentnih gena u različitim fazama razvića kičice

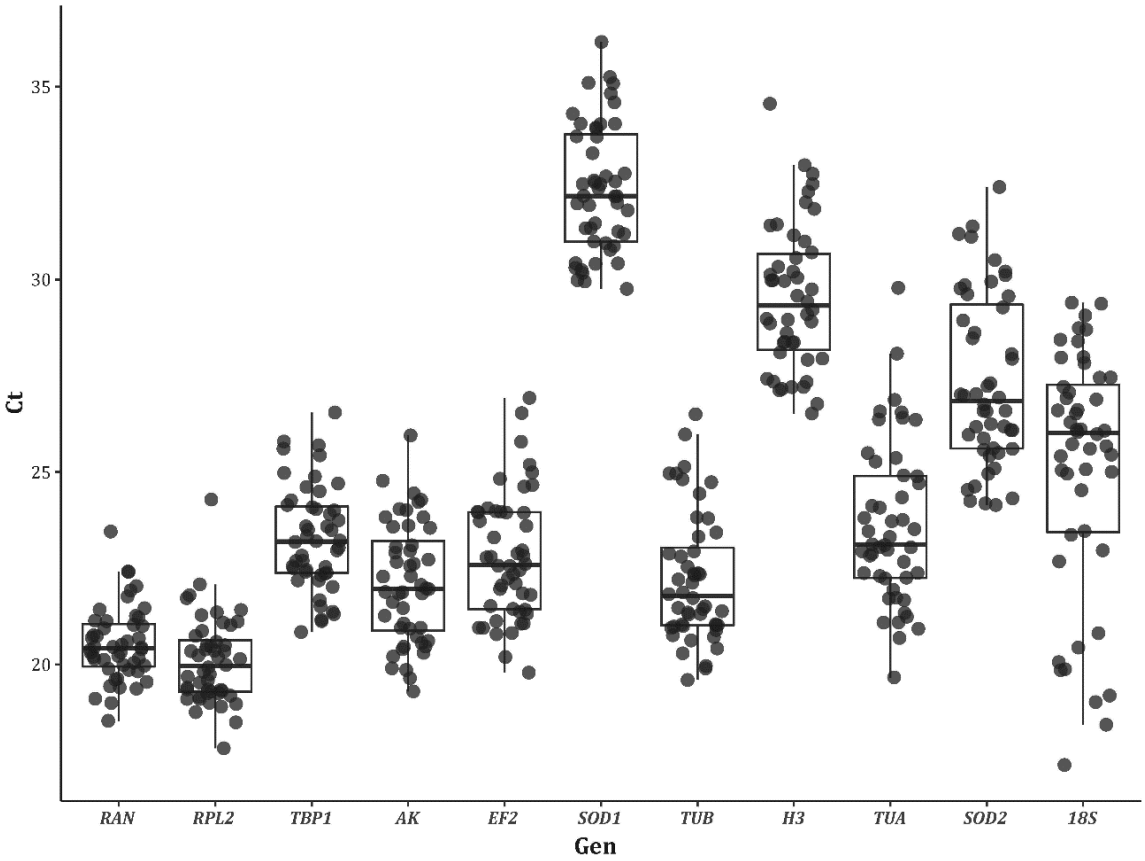
4.3.1. Evaluacija ekspresije *housekeeping* gena u kolekciji tkiva

Na osnovu podataka iz literature odabrano je 11 često korišćenih *housekeeping* gena čije su sekvence pronađene u transkriptomu kičice. Jedino su univerzalni prajmeri za *18S rRNA* prethodno testirani u kičici (Bogdanović i sar. 2013). Ekspresija odabranih gena je određena RT-qPCR metodom u 16 uzoraka tkiva i organa kičice (**Tabela 1.**), sa ciljem da se identifikuju geni koji se stabilno eksprimiraju u različitim tipovima uzoraka i koji će se ubuduće koristiti kao referentni geni u analizama ekspresije gena. Uzorci su sakupljeni prema preceduri opisanoj u poglavljima 3.1.1., 3.1.2. i 3.1.3. Specifičnost dizajniranih prajmera za odabrane gene (**Tabela 9.**) je potvrđena PCR-om praćenim elektroforezom na agaroznom gelu (**Slika 29.**).



Slika 29. Specifičnost parova prajmera za *housekeeping* gene. Jednake količine cDNK iz različitih uzoraka su pomešane i iskorišćene kao matrica za PCR. Elektroforeza na 2% agaroznom gelu je pokazala specifičnu amplifikaciju amplikona očekivane veličine za svaki referentni gen. Sekvence prajmera i očekivane dužine amplikona su date u **Tabeli 9**. DNK marker (trake u prvoj koloni) je izražen u bp.

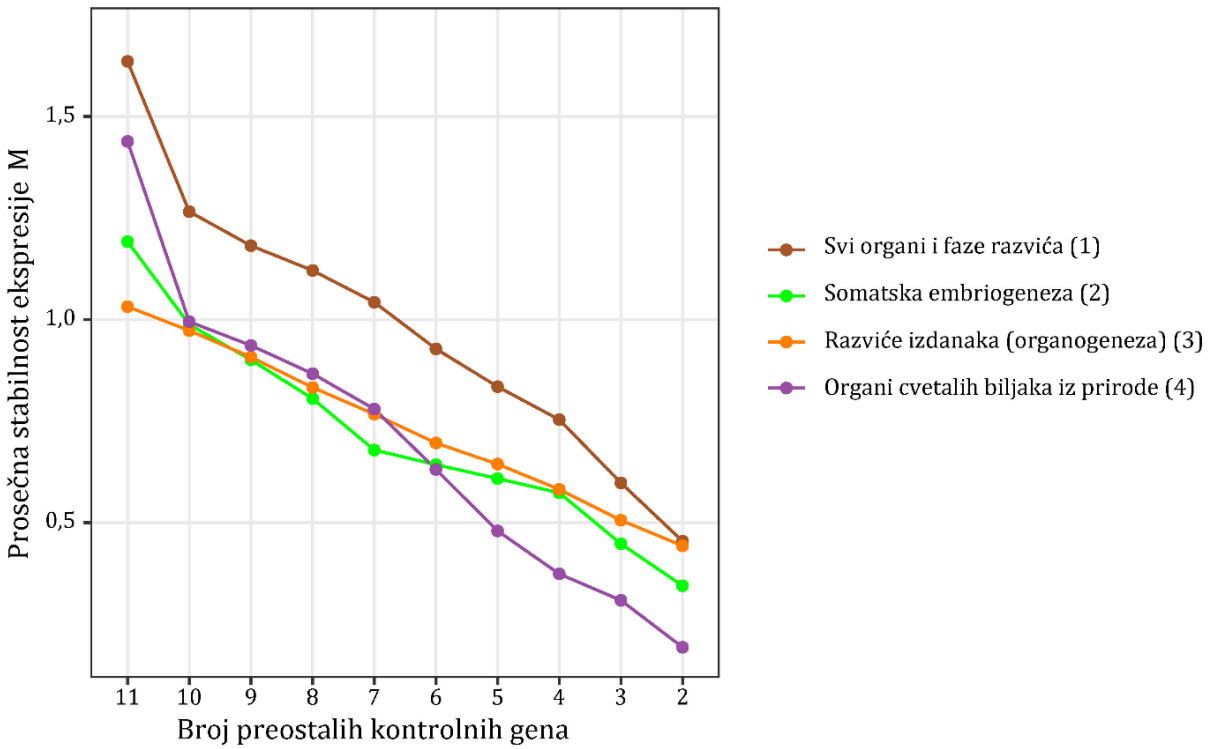
Nivoi ekspresije 11 gena kandidata u 16 uzoraka tkiva su prikazani na **Slici 30.** u vidu Ct vrednosti. Medijane Ct vrednosti većine testiranih gena se nalaze u rasponu od 15 do 30. Među njima, *Fe-SOD1* i *H3* imaju najviše medijane - 32,16 i 29,31 ciklusa što ukazuje na najniži nivo ekspresije. Sa druge strane, *RPL2* i *RAN* pokazuju najmanje vrednosti medijane - 19,96 i 20,42, što označava najviši nivo ekspresije (**Slika 30.**). Isto tako, geni *RAN*, *RPL2* i *TBP1* imaju uske interkvartilne opsege i najkraće „*whiskers*", koji ukazuju na veću stabilnost ekspresije u različitim uzorcima tkiva i faza razvića. Za razliku od njih, *Fe-SOD2* i posebno *18S rRNA* imaju najveći opseg Ct vrednosti, te se ne mogu smatrati za stabilno eksprimirane gene. Treba napomenuti da je *18S rRNA* amplifikovan iz iste cDNK mešavine kao i svi drugi geni, pripremljen reverznom transkripcijom korišćenjem oligo(dT) prajmera. Iako *18S rRNA* nema poli(A) rep, ovaj pristup omogućava reverznu transkripciju samo malog dela *18S rRNA* koji se eksprimira, pa su Ct vrednosti za *18S rRNA* uporedive sa ostalim testiranim genima (Bogdanović i sar. 2013).



Slika 30. RT-qPCR Ct vrednosti za 11 gena kandidata u 16 uzoraka tkiva. „Boksovi" prikazuju raspon vrednosti od gornjeg do donjeg kvartila sa naznačenom vrednosti medijane. Vertikalne linije („*whiskers*") označavaju minimalne i maksimalne Ct vrednosti. Tačke predstavljaju Ct vrednosti, nasumično pomerene po x-osi radi bolje vidljivosti. Geni su aranžirani prema rastućoj standardnoj devijaciji. Objašnjenja skraćenica testiranih gena su data u **Tabeli 4**.

4.3.2. Analiza stabilnosti ekspresije *housekeeping* gena pomoću *geNorm* i *NormFinder* softvera

Testirani *housekeeeping* geni su rangirani prema stabilnosti ekspresije u različitim skupovima uzoraka i naznačen je broj referentnih gena neophodnih za optimalnu normalizaciju. *GeNorm* računa stabilnost ekspresije pomoću M vrednosti, koje predstavljaju prosečnu varijaciju u ekspresiji ciljnog gena u odnosu na ostale kandidate (Vandesompele i sar. 2002), pri čemu niže M vrednosti ukazuju na veću stabilnost ekspresije gena. Stabilnost ekspresije 11 testiranih gena procenjena *geNorm* metodom se razlikovala u četiri testirana skupa uzoraka (**Slika 31.**). Prosečna M vrednost za svih 11 gena bila je ispod 1,5 u svim skupovima uzoraka, osim u najvećem i najrazličitijem skupu uzoraka - „svi organi i stadijumi razvića". Kada se razmatraju tri gena za normalizaciju podataka, tada je najstabilnija ekspresija zabeležena u skupu uzoraka iz prirode, dok je najmanja stabilnost primećena u grupi svih organa i stadijuma razvića (**Slika 31.**). Redosled gena na osnovu njihovih M vrednosti, od najstabilnijeg genskog para (koji se pomoću *genNorm*-a ne može rangirati po redosledu) do najmanje stabilnog, za svaki od četiri skupa uzoraka, dat je u **Tabeli 23.** Prema *geNorm*-u, *RPL2* se pojavljuje među tri najstabilnija gena u svim setovima uzoraka, i u kombinaciji sa *RAN*, *AK* i/ili *TBP1*, može se koristiti kao pouzdan referentni gen u kičici.



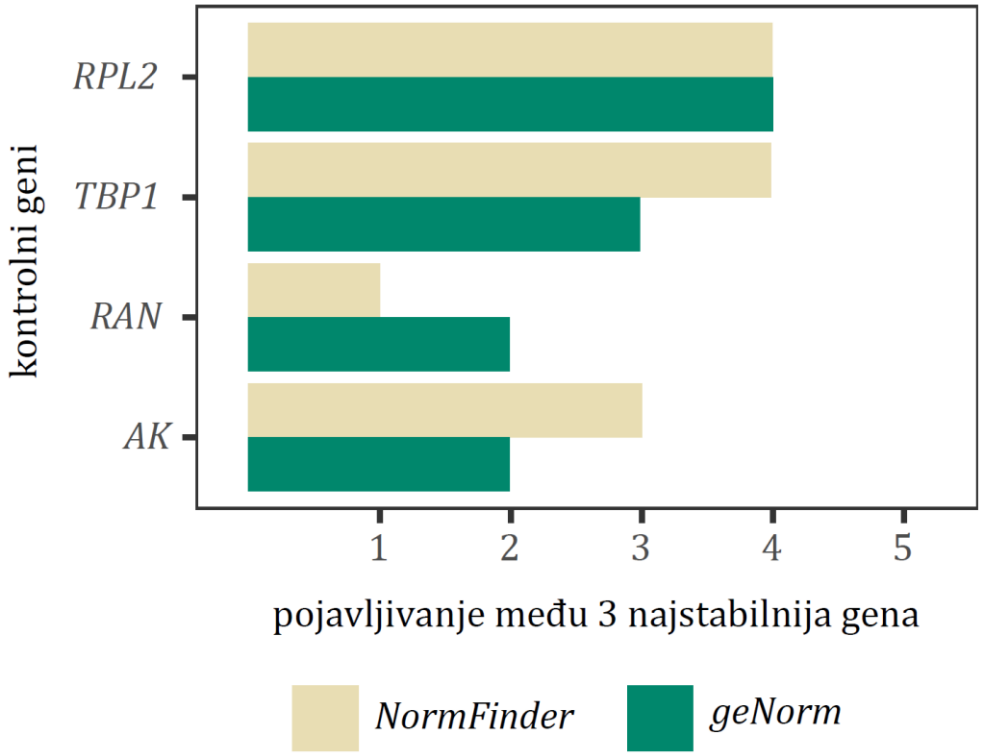
Slika 31. Vrednosti stabilnosti ekspresije (M) izračunate pomoću *geNorm*-a u četiri skupa uzoraka. Niža M vrednost ukazuje na stabilniju ekspresiju.

Rezultati dobijeni pomoću algoritma *NormFinder* navedeni su u **Tabeli 23**. *TBP1* je najbolje rangiran gen u skupu svih organa i faza razvića i u organogenim tkivima, dok je *RPL2* najstabilnije eksprimiran tokom SE i u uzorcima cvetalih biljaka iz prirode.

Tabela 23. Rangiranje 11 *housekeeping* gena u kičici prema stabilnosti njihovih ekspresija pomoću *NormFinder* i *geNorm* u četiri skupa uzoraka. Geni su rangirani od najstabilnijeg do najmanje stabilnog na osnovu vrednosti stabilnosti ekspresija procenjenih algoritmom *NormFinder* (*NF*). Paralelno je prikazana procena stabilnosti ekspresije dobijena korišćenjem algoritma *geNorm* (*gN*), pri čemu se dva najstabilnija gena u svakom skupu uzoraka ne mogu rangirati po redu, zbog toga što je za procenu stabilnosti neophodan odnos gena. Skupovi uzoraka 1-4 su prikazani na **Slici 16**. 1 - svi organi i faze razvića; 2 - uzorci koji predstavljaju proces somatske embriogeneze; 3 - uzorci koji predstavljaju proces organogeneze; 4 - organi cvetalih biljaka iz prirode. Skraćenice gena su navedene u **Tabeli 9**.

Set	**1. Svi organi i stadijumi razvića**		**2. SE**		**3. Organogeneza**		**4. Uzorci iz prirode**	
Redosled	***NF***	***gN***	***NF***	***gN***	***NF***	***gN***	***NF***	***gN***
1	*TBP1*	*RAN/ RPL2*	*RPL2*	*AK/ RPL2*	*TBP1*	*RPL2/ TBP1*	*RPL2*	*RAN/ RPL2*
2	*RPL2*		*TBP1*		*RPL2*		*TBP1*	
3	*AK*	*TBP1*	*AK*	*TBP1*	*AK*	*TUB*	*RAN*	*AK*
4	*RAN*	*EF2*	*TUB*	*TUB*	*TUB*	*TUA*	*EF2*	*EF2*
5	*SOD1*	*AK*	*EF2*	*TUA*	*SOD1*	*AK*	*TUA*	*TBP1*
6	*TUB*	*SOD1*	*H3*	*H3*	*18S*	*RAN*	*AK*	*TUA*
7	*EF2*	*TUB*	*SOD1*	*RAN*	*H3*	*H3*	*SOD1*	*SOD2*
8	*H3*	*TUA*	*RAN*	*SOD1*	*EF2*	*EF2*	*SOD2*	*H3*
9	*18S*	*H3*	*TUA*	*EF2*	*SOD2*	*SOD1*	*18S*	*TUB*
10	*SOD2*	*SOD2*	*SOD2*	*18S*	*TUA*	*SOD2*	*H3*	*SOD1*
11	*TUA*	*18S*	*18S*	*SOD2*	*RAN*	*18S*	*TUB*	*18S*

Poređenjem rezultata ova dva algoritma (**Slika 32.**), primećuje se da oba svrstavaju *RPL2* među tri najstabilnija gena u svim grupama uzoraka. *TBP1* je takođe rangiran kao jedan od tri najstabilnija gena u svim grupama uzoraka prema *NormFinder* algoritmu, dok je prema *geNorm*-u to slučaj u tri grupe. *NormFinder* algoritam svrstava *AK* među tri najstabilnija gena u tri od četiri grupe uzoraka, dok je prema *geNorm*-u najstabilniji u dve grupe. Za razliku od njih, *RAN* je najstabilniji samo u jednoj (uzorci iz prirode), odnosno dve grupe (uzorci iz prirode i svi organi i stadijumi razvića), prema *NormFinder*-u i *geNorm*-u, redom (**Tabela 23.**).

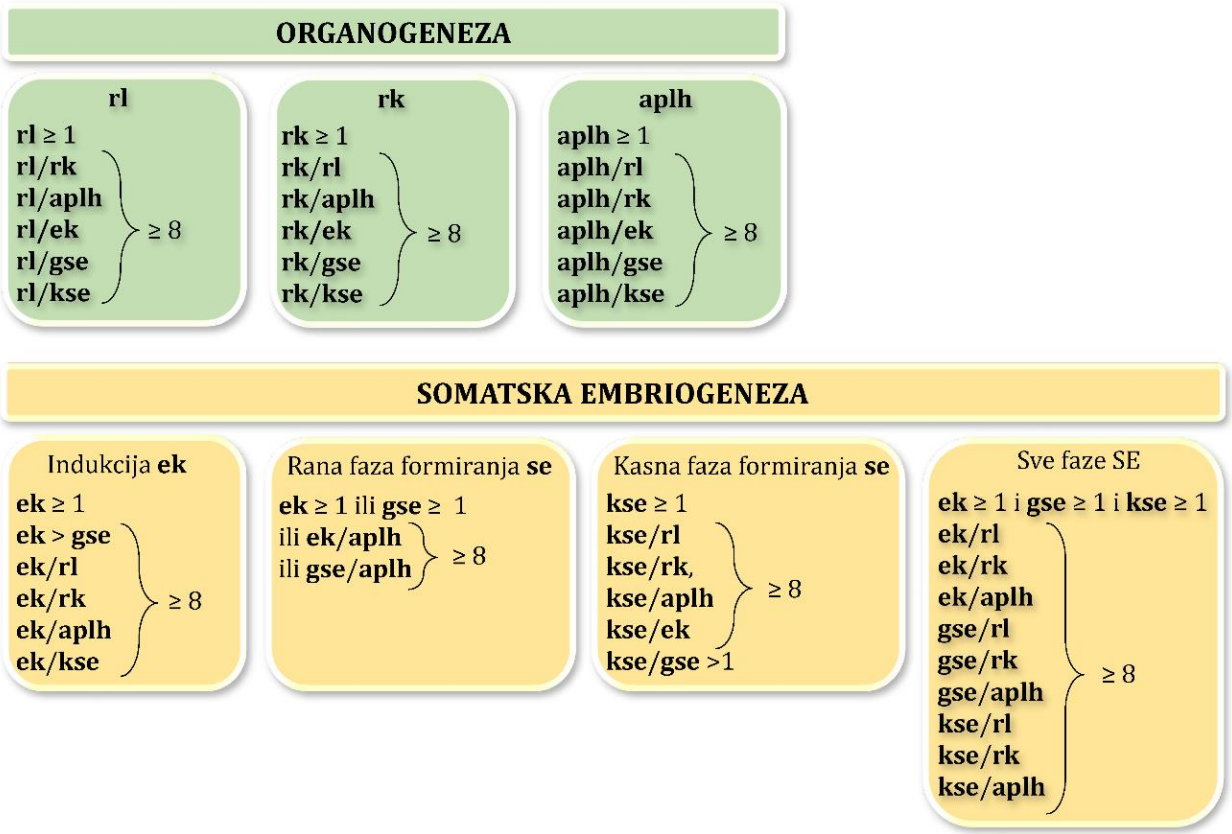


Slika 32. Poređenje dobijenih rezultata pomoću *geNorm* i *NormFinder* algoritama. Oba pristupa pronalaze *RPL2* među tri najstabilnija gena u najvećem broju skupova uzoraka.

4.4. Identifikacija potencijalnih gena markera SE i evaluacija njihove ekspresije

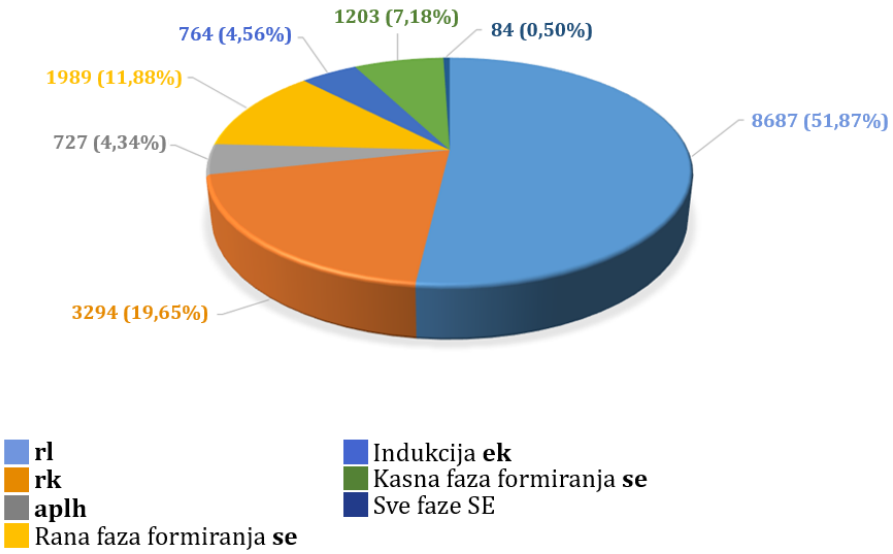
4.4.1. Identifikacija pretpostavljeno diferencijalno eksprimiranih gena tokom SE i organogeneze u transkriptomu

Identifikacija gena sa diferencijalnom ekspresijom omogućava uvid u specijalizovane razvojne procese u ciljnim tkivima. Sa ovim ciljem, ukupno 160839 transkripata kičice poreklom iz organogenih (**rl**, **rk**, **aplh**) i embriogenih tkiva (**ek gse kse**), podvrguto je pažljivo planiranom filtriranju kako bi se identifikovali geni koji se aktiviraju tokom organogeneze i SE (**Slika 33.**).



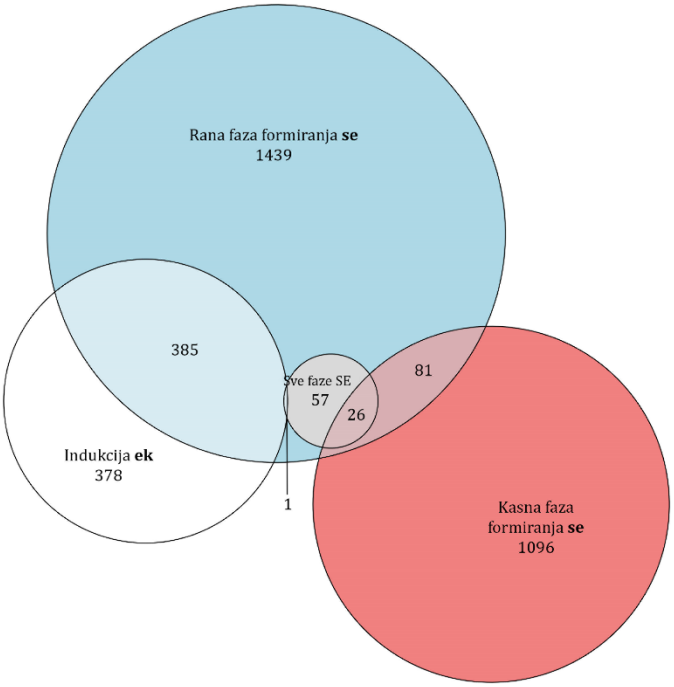
Slika 33. Uslovi filtriranja gena na osnovu *FPKM* vrednosti transkripata. **rl** – list rozete; **rk** – koren rozete; **aplh** – adv. pupoljci sa lista; **ek** – embriogeni kalus; **gse** – globularni somatski embrion; **kse** – kotiledonarni somatski embrion. Tkiva **rl** i **rk** gajena su na hranljivoj podlozi bez RRB, dok su **aplh** indukovani na MS podlozi sa dodatkom 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU, na svetlu. Embriogena tkiva **ek**, **gse** i **kse** dobijena su na MS podlozi sa 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU, u mraku.

Filtriranjem se izdvojilo sedam grupa gena sa ukupno 16748 pogodaka (**Slika 34.**). Najveći broj gena izdvojio se pod uslovima za pronalazak DEG u listovima i korenovima rozete; od toga, više od polovine identifikovanih gena (8687 ili 51,87%) nalazilo se u listovima, dok je u korenovima pronađeno 3294 gena (19,67%, **Slika 34.**). Ukupno 727 gena (4,34%) je detektovano kao specifično eksprimirano u **aplh**. Kada su u pitanju embriogena tkiva, najveći udeo od ukupnog broja gena je pripadao DEG tokom ranih faza formiranja **se** (1989 ili 11,88%), dok je 764 (4,56%) identifikovano kao specifično za indukciju **ek** (**Slika 34.**). Kasnoj fazi formiranja **se**, odnosno DEG u **kse** je pripadalo 1203, odnosno 7,18% od ukupnog broja gena. Na kraju, samo 84 gena (0,50%) se izdvojilo u grupi svih faza SE (**Slika 34.**), pod najstrožijim uslovima filtriranja (**Slika 34.**). Prvih 10 najvećih *FPKM* vrednosti su se kretale u rasponu od 12827,16 – 2608,47 (**rl**), 8212,31 – 447,71 (**rk**), 54,835 – 11,578 (**aplh**), 412,90 – 30,56 (**ek**), 34,43 – 10,838 (kasna faza formiranja **se**), 2056,18 – 60,23 (rana faza formiranja **se**) i 39,33 – 5,02 (sve faze SE).



Slika 34. Kružni dijagram koji prikazuje distribuciju tkivno-specifičnih i DEG u transkriptomu kičice. Procenti su izračunati u odnosu na ukupan broj izdvojenih DEG (16748).

Kako je u fokusu ove disertacije proučavanje gena koji su specifično aktivni tokom SE, dalje su detaljnije razmatrani setovi DEG u embriogenim tkivima. Bitno je napomenuti da nisu svi isfiltrirani geni bili jedinstveni za određeni uslov, što je i očekivano, budući da se neki od uslova u izvesnoj meri preklapaju. Najviše jedinstvenih gena je zabeleženo tokom rane faze formiranja **se** (1439); slede kasna faza formiranja **se** (1096), i indukcija **ek** sa 378 pogodaka (**Slika 35.**). Svi geni iz najmanje grupe svih faza SE su zapravo podskup drugih grupa i nemaju nijedan jedinstveni pogodak (**Slika 35.**).



Slika 35. Ojlerov (engl. „*Euler*“) dijagram sa prikazanim brojem jedinstvenih i DEG koji su zastupljeni u više od jedne grupe isfiltriranih gena tokom različitih faza SE kod kičice.

Prosečna dužina nukleotidnih sekvenci je uglavnom slična u većini grupa i iznosi ~ 300 bp, osim u biblioteci koja obuhvata sve faze SE gde je prosečna dužina nešto veća (507,19 bp, **Tabela 24.**). Kada se uporedi odnos broja gena sa i bez dostupne anotacije, koji su označeni kao *NA* (engl. „*Not Applicable*"), primetno je da je on donekle ujednačen u *nt* bazi, dok je u *SwissProt* bazi uočen veći procenat neanotiranih sekvenci, od 60,71% (sve faze SE) do 74,98% (kasna faza SE, **Tabela 24.**).

Tabela 24. Pregled analize subsetova potencijalnih DEG tokom SE kod kičice.

Karakteristike DEG tokom SE	Indukcija **ek**	Rana faza formiranja **se**	Kasna faza formiranja **se**	Sve faze SE
Broj gena	764	1989	1203	84
Broj gena sa pogotkom u *Swissprot* bazi	198 (25,92%)	522 (26,24%)	301 (25,02%)	33 (39,29%)
Broj gena bez pogotka u *Swissprot* bazi (*NA*)	566 (74,08%)	1467 (73,76%)	902 (74,98%)	51 (60,71%)
Broj gena sa pogotkom u *nt* bazi	338 (44,24%)	870 (43,74%)	518 (43,06%)	42 (50%)
Broj gena bez pogotka u *nt* bazi (*NA*)	376 (55,76%)	1119 (52,26%)	685 (59,94%)	42 (50%)
Prosečna dužina sekvenci (bp)	310,26	331,19	341,18	507,19

4.4.2. Izbor potencijalnih molekularnih markera SE u transkriptomu kičice

U naporima da se identifikuju geni povezani sa SE u transkriptomu kičice, pažljivo su analizirane grupe gena sa *FPKM* vrednostima koje ukazuju na diferencijalnu ekspresiju u embriogenim tkivima - embriogenom kalusu (**ek**), globularnim (**gse**) i kotiledonarnim somatskim embrionima (**kse**). Radi odabira gena markera SE koji su ranije prijavljeni u drugim vrstama, a koji su takođe prisutni u podacima iz transkriptoma kičice, pregledana je relevantna literatura uz korišćenje *SwissProt*, *nt*, *Pfam i GO* anotacija, s posebnim naglaskom na *SwissProt* i *nt* anotacije.

Transmembranske receptorne kinaze SERK su poznati molekularni markeri SE koji učestvuju u inicijaciji tog procesa. U transkriptomu kičice identifikovan je gen *CeSERK1* (TR38192|c1_g2_i6) sa proteinskom homologijom od 2,97 E^{-23} i nukleotidnom sličnošću od 1,36 E^{-10} sa *SERK1* genom iz vrste *Rosa chinensis* (**Tabela 25.**). Iako su *FPKM* vrednosti niske (**Tabela 26.**), pretpostavljena ekspresija *CeSERK1* je 10 puta veća u **gse** u poređenju sa **aplh** (**Tabela 27.**). Pored gena koji su neophodni za inicijaciju SE, određeni geni su važni za razviće **se**, kao što je gen za TF sa MADS boks domenom, AGL. Pretragom DEG biblioteke kičice pronađen je gen *CeAGL65-like* (TR7267|c0_g1_i3) sa 2,14 E^{-38} sličnosti u proteinskim, odnosno 1,62 E^{-42} sličnosti u nukleotidnim sekvencama sa *AGL65* genom *Nicotiana tomentosiformis* (**Tabela 25.**). Ovaj gen se najviše eksprimira u **kse** (**Tabela 27.**), sa *FPKM* vrednošću od 6,91 (**Tabela 26.**). U transkriptomu kičice su identifikovani i neki od gena koji su povezani sa sintezom auksina. Na primer, gen za enzim TAR1 (*CeTAR1*, TR20674|c0_g3_i1), koji konvertuje triptofan u IPA, sa E vrednošću od 3,68 E^{-23} (*SwissProt*), diferencijalno se eksprimira u **kse** (*FPKM* = 9,44, **Tabela 27.**), dok je u svim ostalim tkivima njegova ekspresija ispod jedan (**Tabela 26.**). U transkriptomu je takođe identifikovan gen koji pretpostavljeno kodira flavin-monooksigenazu YUC7 (*CeYUC7*, TR46165|c0_g1_i1), sa proteinskom sličnošću od 2,41 E^{-34} i nukleotidnom homologijom od 7,52 E^{-42} sa *YUC7* genom *Ipomoea nil* (**Tabela 25.**). Iako se *CeYUC7* diferencijalno eksprimira u **kse** (**Tabela 27.**), *FPKM* vrednost je veoma niska i iznosi 1,67

(**Tabela 26.**). Gen koji pretpostavljeno kodira za enzim ACS3 (*CeACS3*, TR36872|c0_g1_i2) koji učestvuje u sintezi etilena pronađen je u transkriptomu kičice (**Tabela 25.**). Iako je E vrednost prema obe baze jednaka nuli, što ukazuje na nisku sličnost sa pomenutim genom, *CeACC3* se diferencijalno eksprimira u **ek** i zbog toga je odabran za dalju analizu (**Tabela 27.**, **Tabela 26.**). Geni iz Grečen Hagen porodice su uključeni u metabolizam auksina i jedan od njih, sa visokom proteinskom i nukleotidnom (4,22 E^{-108} i 2,74 E^{-61}, redom) homologijom sa *GH3.6* genom iz *Ricinus communis* (*CeGH3.6*, TR39668_c4_g1_i1), identifikovan je u transkriptomu kičice (**Tabela 25.**). Ovaj gen je aktivan tokom SE, dok u organogenim tkivima nema detektovanu ekspresiju (**Tabela 26.**). Pored toga, u kičici je pronađen gen iz familije *AUX/IAA*, *CeIAA32* (TR21282|c0_g1_i1), koji pretpostavljeno učestvuje u putevima signalne transdukcije auksina (**Tabela 25.**). *CeIAA32* je diferencijalno eksprimiran u **kse** sa E vrednošću od 5,54 E^{-52} (*SwissProt*) i 1,44 E^{-64} sa *Nicotiana attenuata IAA32-like* genom (*nt*) (**Tabela 25.**, **Tabela 27.**, **Tabela 26.**).

Pored gena koji se mogu dovesti u vezu sa SE na osnovu literature, iz transkriptoma je odabrano još devet kandidata koji se prema *FPKM* vrednostima specifično aktiviraju tokom SE (**Tabela 25.**, **Tabela 27.**, **Tabela 26.**). Jedan od ovih gena je *CeRNS3* (TR25654|c0_g1_i1), za koji se pretpostavlja da kodira ribonukleazu 3, sa proteinskom homologijom prema *SwissProt*-u 1,98 E^{-17} i diferencijalnom ekspresijom tokom ranog formiranja **se** (**Tabela 25.**, **Tabela 27.**). Ovaj gen nema anotaciju u *nt* bazi. Geni za protein sličan proteinu DC2.15 (*CeDC2.15-like*, TR12274|c0_g1_i1) i protein sličan proteinu GRP3 (*CeGRP3-like,* TR3877|c0_g1_i1) su se takođe izdvojili kao DEG tokom ranih faza formiranja **se** (**Tabela 27.**). Iako nisu pronađeni u *SwissProt* bazi, relativno slabe *nt* homologije (3,3 E^{-15} i 2,37 E^{-6} za *CeDC2.15-like* i *CeGRP3-like*, redom, **Tabela 25.**) ukazuju da ovi geni pretpostavljeno kodiraju za proteine bogate prolinom (*CeDC2.15-like*) i glicinom (*CeGRP3-like*). *CeGRP3-like* se diferencijalno eksprimira u svim embriogenim tkivima, dok u organogenim tkivima ekspresija nije detektovana (*FPKM* = 0), dok je *CeDC2.15-like* diferencijalno eksprimiran u ranim fazama embriogeneze sa maksimumom ekspresije u **ek** (*FPKM* = 83,16, **Tabela 27.**, **Tabela 26.**).

Protein PR10 i taumatinu sličan protein 1 (TLP1) pripadaju proteinima odbrane koji predominatno učestvuju u odbrani od patogena. *CePR10* pokazuje najveću zabeleženu *FPKM* vrednost u **ek** od svih odabranih kandidata (*FPKM* = 2056,18, **Tabela 26.**). Na osnovu niskih *SwissProt* i *nt* E vrednosti (1,03 E^{-46} i 5,43 E^{-57}, redom), sa izvesnom sigurnošću se može tvrditi da *CePR10* kodira za protein iz PR10 porodice alergena (**Tabela 25.**). Sa druge strane, *CeTLP1-like* (TR30219|c0_g1_i1) se predominantno eksprimira u **kse** sa najvećom *FPKM* vrednošću u **kse** (17,78, **Tabela 27.**, **Tabela 26.**). Takođe, pokazuje snažnu proteinsku (1,39 E^{-107}) i nukleotidnu (5,41 E^{-135}) homologiju sa *TLP1* genom *Olea europaea* (**Tabela 25.**). Još jedan od odabranih kandidata je gen koji kodira za protein sličan PCC13-62 proteinu, *CePCC13-62-like* (TR30412|c0_g1_i1) koji se diferencijalno eksprimira u **ek** (*FPKM* = 30,60, **Tabela 27.**, **Tabela 26.**). Prema E vrednostima iz *SwissProt* (1,05 E^{-92}) i *nt* (4,34 E^{-98}) baze podataka, pretpostavlja se da ovaj gen učestvuje u procesu desikacije (**Tabela 25.**).

Za sekvence *CeNA1* (TR23240|c0_g1_i1), *CeNA2* (TR48752|c0_g1_i1) i *CeNA4* (TR1001|c0_g1_i1) nije postojala nikakva dostupna anotacija u transkriptomu, osim informacija o dužini transkripata (*CeNA1* - 725 bp, *CeNA2* - 441 bp, *CeNA4* - 274 bp, **Tabela 25.**). *CeNA1* i *CeNA2* pokazuju sličan trend u ekspresiji, pri čemu *CeNA1* ima nešto više *FPKM* vrednosti. Oba transkripta su gotovo van detekcije u organogenim tkivima, dok se najviša zabeležena ekspresija u **ek** postepeno smanjuje kroz **gse** i **kse** (**Tabela 27.**, **Tabela 26.**). Sa druge strane, *CeNA4* se diferencijalno eksprimira u **kse** (*FPKM* = 10,84), sa *FPKM* vrednostima koje su gotovo van detekcije u ostalim tkivima, te *CeNA4* potencijalno može imati ulogu tokom kasne faze SE (**Tabela 27.**, **Tabela 26.**).

Tabela 25. Odabrani genski kandidati sa potencijalnom ulogom tokom SE kod kičice. U tabeli su prikazani pretpostavljeni nazivi proteina i gena sa pristupnim bojem transkripata, dostupne anotacije prema *nt* i *SwissProt bazi*, E vrednost prema *SwissProt* i dužina nukleotidne sekvence. Transkripti bez anotacije označeni su kao *NA*.

Genski produkt/gen		***Trinity ID* transkripta**	**Proteinska homologija (*SwissProt*)**	**E vrednost (*SwissProt*)**	**Nukleotidna homologija (*nt*)**	**E vrednost (*nt*)**	**Dužina (bp)**
Protein iz PR10 porodice alergena	*CePR10*	TR28332|c0_g4_i1	PRU1_PRUARRecName: Full=Major allergen Pru ar 1; AltName: Allergen=Pru ar 1	1,03 E^{-46}	*Solanum tuberosum* major allergen Pru ar 1-like (LOC102580863), mRNA	5,43 E^{-57}	818
Ribonukleaza 3	*CeRNS3*	TR25654|c0_g1_i1	RNS3_ARATHRecName: Full=Ribonuclease 3; Flags: Precursor	1,98 E^{-17}	*NA*	*NA*	1213
DC2.15 proteinu sličan	*CeDC2.15-like*	TR12274|c0_g1_i1	*NA*	*NA*	*Olea europaea var. sylvestris* 14 kDa proline-rich protein DC2.15-like (LOC111374281), mRNA	3,3 E^{-15}	251
Glicinom bogatom proteinu 3 sličan	*CeGRP3-like*	TR3877|c0_g1_i1	*NA*	*NA*	*Nicotiana sylvestris* glycine-rich protein 3-like (LOC104219161), transcript variant X2, mRNA	2,37 E^{-6}	355
PCC13-62 proteinu sličan	*CePCC13-62-like*	TR30412|c0_g1_i1	DRPE_CRAPLRecName: Full=Desiccation-related protein PCC13-62; Flags: Precursor	1,05 E^{-92}	*Capsicum annuum* desiccation-related protein PCC13-62-like (LOC107839603), mRNA	4,34 E^{-98}	1168
ACS sintaza 3	*CeACS3*	TR36872|c0_g1_i2	1A13_SOLLCRecName: Full=1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 3; Short=ACC synthase 3; AltName: Full=Le-ACS3; Short=ACS-3; AltName: Full=S-adenosyl-L-methionine methylthioadenosine-lyase 3	0	*Nicotiana attenuata* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 3 (LOC109218840), mRNA	0	1972

Nastavak **Tabele 25.** na strani 71.

Taumatinu sličan protein 1	*CeTLP1-like*	TR30219|c0_g1_i1	TLP1-like_ARATHRecName: Full=Thaumatin-like protein 1; Short=AtTLP1	1,39 E^{-107}	*Olea europaea* var. *sylvestris* thaumatin-like protein 1 (LOC111401272), mRNA	5,41 E^{-135}	1197
Triptofan aminotransferaza 1	*CeTAR1*	TR20674|c0_g3_i1	TAA1_KLULARecName: Full=Protein TAA1	3,68 E^{-23}	*Armillaria mellea* isolate MEX100 5.8S ribosomal RNA gene sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene sequence	0	379
IAA32	*CeIAA32*	TR21282|c0_g1_i1	IAA32_ARATHRecName: Full=Auxin-responsive protein IAA32; AltName: Full=Indoleacetic acid-induced protein 32	5,54 E^{-52}	*Nicotiana attenuata* auxin-responsive protein IAA32-like (LOC109235840), mRNA	1,44 E^{-64}	861
Protein sa MADS boks domenom sličan Agamusu 65	*CeAGL65-like*	TR7267|c0_g1_i3	AGL65_ARATHRecName: Full=Agamous-like MADS-box protein AGL65	2,14 E^{-38}	*Nicotiana tomentosiformis* agamous-like MADS-box protein AGL65 (LOC104108062) transcript variant X2, mRNA	1,62 E^{-42}	1827
Grečen Hagen 3	*CeGH3.6*	TR39668_c4_g1_i1	GH36_ARATHRecName: Full=Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.6; AltName: Full=Auxin-responsive GH3-like protein 6; Short=AtGH3-6; AltName: Full=Protein DWARF IN LIGHT 1; Short=DFL-1	4,22 E^{-108}	*Ricinus communis* indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.6 (LOC8287873), mRNA	2,74 E^{-61}	701

Nastavak **Tabele 25.** na strani 72.

Flavin-monoksigenaza 7	*CeYUC7*	TR46165|c0_g1_i1	YUC7_ARATHRecName: Full=Probable indole-3-pyruvate monooxygenase YUCCA7; AltName: Full=Flavin-containing monooxygenase YUCCA7	2,41 E^{-34}	*Ipomoea nil* probable indole-3-pyruvate monooxygenase YUCCA7 (LOC109161643), mRNA	7,52 E^{-42}	231
Serin-treonin kinaza 1	*CeSERK1*	TR38192|c1_g2_i6	SERK1_ARATHRecName: Full=Somatic embryogenesis receptor kinase 1; Short=AtSERK1; AltName: Full=Somatic embryogenesis receptor-like kinase 1;	2,97 E^{-23}	*Rosa chinensis* MDIS1-interacting receptor like kinase 1-like (LOC112177057), mRNA	1,36 E^{-10}	438
Serin-treonin kinaza	*CeSERK*	TR36471|c1_g1_i1	SERK1_ARATHRecName: Full=Somatic embryogenesis receptor kinase 1; Short=AtSERK; AltName: Full=Somatic embryogenesis receptor-like kinase	*NA*	*NA*	*NA*	2875
Nepoznati protein 1	*CeNA1*	TR23240|c0_g1_i1	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	725
Nepoznati protein 2	*CeNA2*	TR48752|c0_g1_i1	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	441
Nepoznati protein 4	*CeNA4*	TR1001|c0_g1_i1	*NA*	*NA*	*NA*	*NA*	274

Tabela 26. *FPKM* vrednosti odabranih potencijalnih gena markera SE u šest sekvenciranih tkiva kičice. **rl** - rozeta listova; **rk** - rozeta korenova; **ek** - embriogeni kalus; **aplh** – adventivni pupoljak obrazovan na MS podlozi sa dodatkom 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU; **gse** - globularni somatski embrion; **kse** - kotiledonarni somatski embrion.

Genski produkt/gen		***Trinity ID* transkripta**	***FPKM* vrednosti**					
			rl	**rk**	**aplh**	**ek**	**gse**	**kse**
Protein PR10 porodice alergena	*CePR10*	TR28332|c0_g4_i1	0,74	50,19	207,14	2056,18	1115,89	363,35
Ribonukleaza 3	*CeRNS3*	TR25654|c0_g1_i1	0,00	0,09	0,36	16,64	5,17	0,90
Protein sličan proteinu DC2.15	*CeDC2.15-like*	TR12274|c0_g1_i1	0,00	6,11	1,25	83,16	62,36	24,07
Glicinom bogatom proteinu 3 sličan	*CeGRP3-like*	TR3877|c0_g1_i1	0,00	0,00	0,00	14,89	11,80	9,32
Protein sličan proteinu PCC13-62	*CePCC13-62-like*	TR30412|c0_g1_i1	0,49	0,98	9,37	30,60	17,57	3,74
ACS sintaza 3	*CeACS3*	TR36872|c0_g1_i2	0,04	0,33	1,63	10,64	5,87	0,90
Taumatinu sličan protein 1	*CeTLP1-like*	TR30219|c0_g1_i1	1,74	1,80	0,78	1,81	4,52	17,78
Triptofan aminotransferaza 1	*CeTAR1*	TR20674|c0_g3_i1	0,37	0,89	0,28	0,30	0,62	9,44
IAA32	*CeIAA32*	TR21282|c0_g1_i1	0,00	0,00	0,71	0,29	0,89	7,98
Grečen Hagen 3	*CeGH3.6*	TR39668_c4_g1_i1	0,00	0,00	0,00	1,90	7,37	3,84
Protein sa MADS boks domenom sličan Agamusu 65	*CeAGL65-like*	TR7267|c0_g1_i3	0,10	0,12	0,08	3,14	3,48	6,91
Flavin-monooksigenaza 7	*CeYUC7*	TR46165|c0_g1_i1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,67
Serin-treonin kinaza 1	*CeSERK1*	TR38192|c1_g2_i6	0,00	0,00	0,22	0,97	2,20	0,90
Serin-treonin kinaza	*CeSERK*	TR36471|c1_g1_i1	38,76	46,06	31,80	34,70	34,88	34,13
Nepoznati protein 1	*CeNA1*	TR23240|c0_g1_i1	0,00	0,00	0,11	39,33	16,05	5,34
Nepoznati protein 2	*CeNA2*	TR48752|c0_g1_i1	0,00	0,00	0,00	11,26	6,56	3,57
Nepoznati protein 4	*CeNA4*	TR1001|c0_g1_i1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,57	10,84

Tabela 27. Faze SE u kojoj odabrani transkripti pokazuju diferencijalnu ekspresiju na osnovu *FPKM* vrednosti iz transkriptoma. Jedino transkript *CeSERK* nije odabran na osnovu postavljenih uslova, već na osnovu anotacije iz kompletnog transkriptoma.

Genski produkt/gen		**ID transkripta**	**Faza SE u kojoj je gen diferencijalno eksprimiran**
Protein PR10 porodice alergena	*CePR10*	TR28332|c0_g4_i1	Indukcija **ek**, rana faza formiranja **se**
Ribonukleaza 3	*CeRNS3*	TR25654|c0_g1_i1	Indukcija **ek**, rana faza formiranja **se**, sva embriogena tkiva
Prolinom bogat protein	*CeDC2.15-like*	TR12274|c0_g1_i1	Rana faza formiranja **se**
Glicinom bogatom proteinu 3 sličan	*CeGRP3-like*	TR3877|c0_g1_i1	Rana faza formiranja **se**, sva embriogena tkiva
Protein povezan sa desikacijom	*CePCC13-62-like*	TR30412|c0_g1_i1	Indukcija **ek**
ACS sintaza 3	*CeACS3*	TR36872|c0_g1_i2	Indukcija **ek**, rana faza formiranja **se**
Taumatinu sličan protein 1	*CeTLP1-like*	TR30219|c0_g1_i1	Kasna faza formiranja **se**
Triptofan aminotransferazi sličan protein 1	*CeTAR1*	TR20674|c0_g3_i1	Kasna faza formiranja **se**
IAA32	*CeIAA32*	TR21282|c0_g1_i1	Kasna faza formiranja **se**
Grečen Hagen 3	*CeGH3.6*	TR39668_c4_g1_i1	Rana faza formiranja **se**, sva embriogena tkiva
Protein sa MADS boks domenom sličan Agamusu 65	*CeAGL65-like*	TR7267|c0_g1_i3	Rana faza formiranja **se**, kasna faza formiranja **se**
Flavin-monoksigenaza 7	*CeYUC7*	TR46165|c0_g1_i1	Kasna faza formiranja **se**
Serin-treonin kinaza	*CeSERK1*	TR38192|c1_g2_i6	Rana faza formiranja **se**
Serin-treonin kinaza 1	*CeSERK*	TR36471|c1_g1_i1	/
Nepoznati protein 1	*CeNA1*	TR23240|c0_g1_i1	Rana faza formiranja **se**, sva embriogena tkiva
Nepoznati protein 2	*CeNA2*	TR48752|c0_g1_i1	Rana faza formiranja **se**, sva embriogena tkiva
Nepoznati protein 4	*CeNA4*	TR1001|c0_g1_i1	Kasna faza formiranja **se**

4.4.3. Evaluacija ekspresije pretpostavljeno diferencijalno eksprimiranih gena u kolekciji tkiva kičice

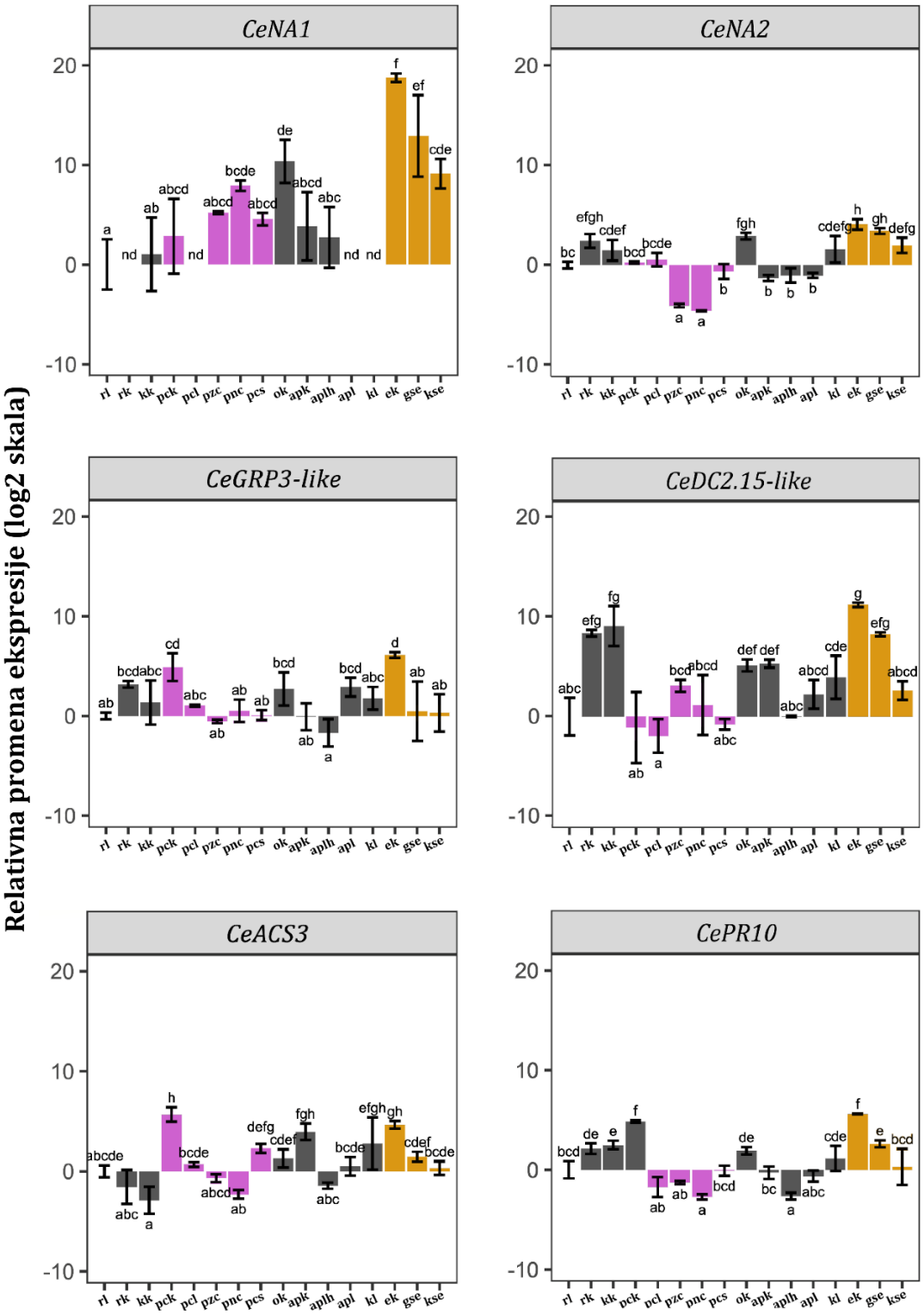
U cilju eksperimentalne potvrde da se genski kandidati odabrani na osnovu *RNA-seq in silico* analize zaista diferencijalno eksprimiraju tokom SE, njihova ekspresija je proverena metodom RT-qPCR u kolekciji uzoraka različitih faza razvića kičice (**Tabela 1.**). Uzorci su prikupljeni po proceduri opisanoj u poglavljima 3.1.1., 3.1.2. i 3.1.3. Ekspresija ovih gena je normalizovana u odnosu na *RPL2* i *TBP1* gene, koji su prethodno dokazani kao najstabilniji referentni geni u većini razvojnih procesa, uključujući SE (poglavlje 4.3.), a rezultati su

prikazani na logaritamskoj skali kao relativne promene genske ekspresije u odnosu na kontrolni uzorak lista rozete (**rl**) (**Slika 36.**, **Slika 37.**, **Slika 38.**).

Profili ekspresije testiranih gena u različitim stadijumima SE (**ek**, **gse**, **kse**) su uglavnom potvrdili predviđanja dobijena analizom *RNA-seq* podataka (**Tabela 26.**, **Tabela 27.**). Međutim, u ekspresiji nekoliko gena su primećena odstupanja. Jedno od značajnijih odstupanja uočeno je kod gena *CePCC13-62-like* (**Slika 38.**), koji pokazuje smanjenu ekspresiju u svim embriogenim tkivima u poređenju sa kontrolnim uzorkom, što se razlikuje od očekivanih rezultata baziranih na *FPKM* vrednostima iz *RNA-seq* analize. Takođe, kod gena *CeGH3.6* primećeni su neusklađeni trendovi u ekspresiji u embriogenim tkivima u odnosu na *FPKM* očekivanja (**Slika 37.**). Važno je napomenuti i da ekspresija većine gena u uzorcima tkiva **rk** i, u manjoj meri, u **aplh** ne pokazuje korelaciju sa pretpostavljenim niskim intenzitetima ekspresije na osnovu *RNA-seq* procene (**Slika 36.**, **Slika 37.**, **Slika 38.**).

Analizom RT-qPCR podataka, ustanovljeno je da se genski kandidati eksprimiraju različitim intenzitetom u embriogenim tkivima (**Slika 36.**). Među njima, ekspresioni profil u potpunosti funkcionalno neokarakterisane sekvence *CeNA1* se istakao kao najupečatljiviji (**Slika 36.**). *CeNA1* se diferencijalno eksprimira u svim embriogenim tkivima (**ek**, **gse**, **kse**) u poređenju sa kontrolom lista. U embriogenom kalusu, *CeNA1* je pokazao izuzetno visoku ekspresiju, čak više od milion puta povećanu u odnosu na **rl**. Osim toga, ekspresija *CeNA1* se postepeno smanjuje tokom razvića **se**, što prati proces diferencijacije. Statistički značajno povećanje ekspresije u odnosu na kontrolu je zapaženo još i u organogenom kalusu (**ok**) i nezrelim cvetovima iz prirode (**pnc**) (**Slika 36.**). Sa druge strane, ekspresija *CeNA1* u klijancima (**kl**), korenovima rozete (**rk**), adventivnim pupoljcima spontano formiranim na eksplantatima listova (**apl**) i listovima cvetalih biljaka (**pcl**) je toliko niska da nije mogla biti detektovana RT-qPCR metodom (**Slika 36.**). *CeNA2* dostiže vrhunac ekspresije u embriogenom kalusu, a onda postepeno opada u **gse** i **kse** (**Slika 36.**). Ovo povećanje ekspresije je statistički značajno u svim embriogenim tkivima, a posebno u **ek**, gde je zabeležena skoro 16 puta veća ekspresija u odnosu na list rozete. S druge strane, u slučaju gena *CeNA4*, primećen je suprotan trend (**Slika 37.**). Njegova ekspresija dostiže maksimum u **kse** (statistički značajno povišena u odnosu na kontrolu), a zatim se postepeno smanjuje prema **gse** i na kraju **ek**, što odgovara pretpostavljenim vrednostima na osnovu *FPKM*. Oba gena se u **ok** eksprimiraju sa sličnim intenzitetom kao u **ek** (**Slika 36.**, **Slika 37.**). Pored toga, primećene su dodatne statistički značajne promene u ekspresiji. U slučaju gena *CeNA2*, zabeleženo je statistički značajno povećanje ekspresije u korenovima rozete (**rk**). Takođe, ekspresija gena *CeNA2* je statistički značajno smanjena u svim adv. pupoljcima u poređenju sa kontrolom i embriogenim tkivima (**Slika 36.**). Što se tiče gena *CeNA4*, ekspresija u spontano formiranim adventivnim pupoljcima (**apl** i **apk**) je niska i nalazi se na nivou kontrole, dok se u **aplh** statistički značajno povećava u odnosu na kontrolu (**Slika 37.**). Na kraju, oba gena, kako *CeNA2*, tako i *CeNA4*, imaju nisku ekspresiju u uzorcima organa iz prirode, pri čemu je najniža zabeležena ekspresija u zrelim (**pzc**), i nezrelim cvetovima (**pnc**) što je posebno izraženo kod gena *CeNA2* (**Slika 36.**, **Slika 37.**).

Ekspresija gena *CeGRP3-like* je najviša u **ek** (32 puta više nego u kontroli), a zatim se drastično smanjuje u **gse** i **kse**, dostižući nivo kontrole. Dodatno, ekspresija *CeGRP3-like* u uzorcima iz prirode je pretežno u nivou kontrole, osim u korenovima cvetalih biljaka (**pck**), u kojima je zabeležena visoka ekspresija (**Slika 36.**). Protein bogat prolinom, *CeDC2.15-like* pokazuje visoku ekspresiju u **ek** i **gse** (više od 1000 puta veća u **ek** nego u listovima rozete), dok se ekspresija statistički značajno smanjuje u **kse**. Interesantno je da ovaj gen takođe pokazuje visoku aktivnost u *in vitro* gajenim korenovima (**rk** i **kk**), slično kao u **ek** i **gse**. Ekspresija *CeDC2.15-like* gena u uzorcima iz prirode je manja, pri čemu je najniža ekspresija zabeležena u listovima cvetalih biljaka (**pcl**). Međutim, zbog velikih varijacija među biološkim ponavljanjima, razlika u ekspresiji u odnosu na kontrolu nije statistički značajna (**Slika 36.**).

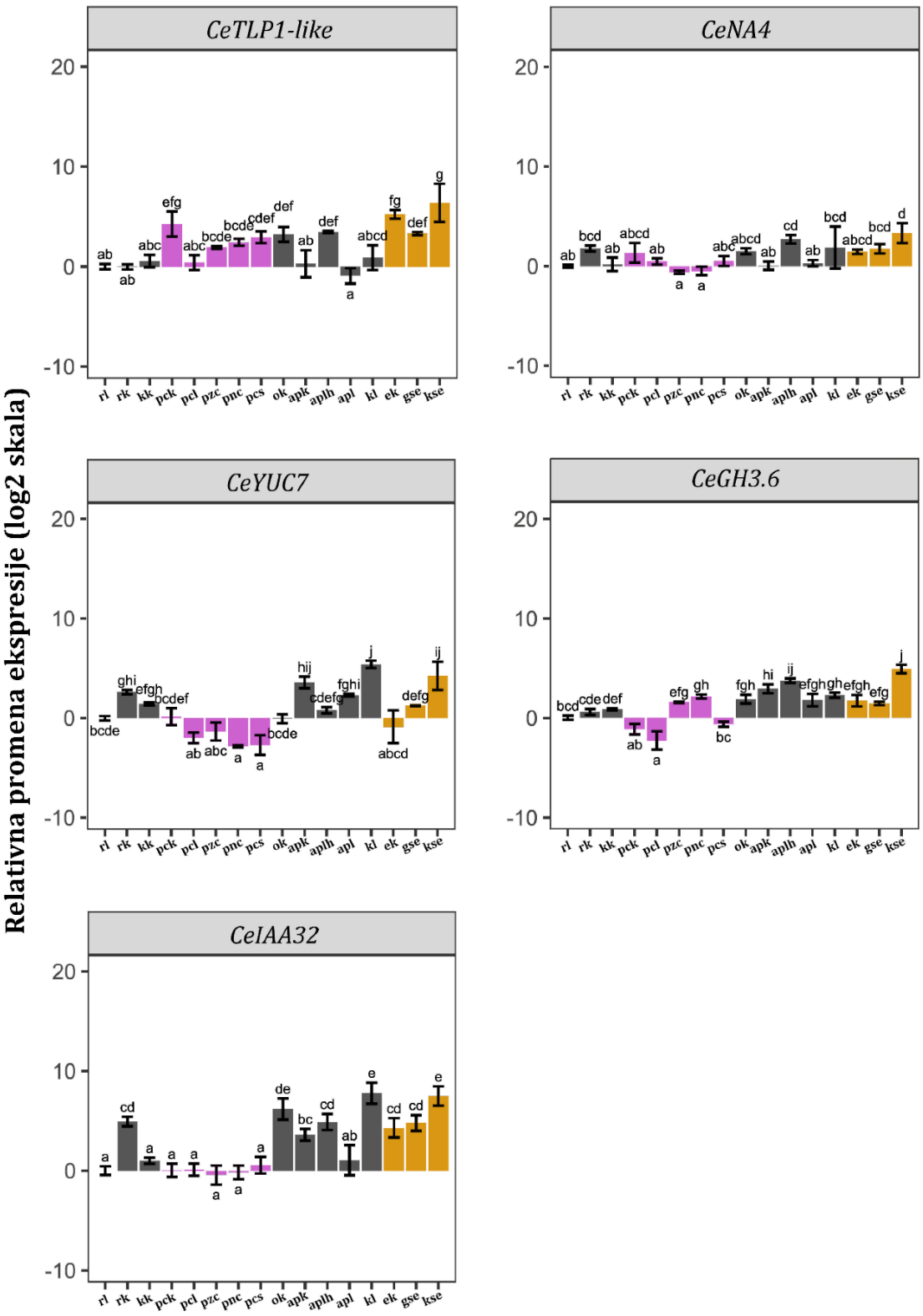


Slika 36. Ekspresioni profili gena u kolekciji 16 tkiva kičice koji tokom SE pokazuju najveću ekspresiju tokom rane faze SE i formiranja embriona. Kao kontrolni uzorak je korišćeno tkivo lista rozete (**rl**). Srednja vrednost i standardne greške srednje vrednosti su prikazane za tri biološka ponavljanja, a različitim slovima na grafiku su označene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu ($p < 0,05$). Ružičasti stubići na graficima označavaju uzorke biljnih organa iz prirode, dok žuto obojeni stubići označavaju tkiva različitih stadijuma SE. Tamno sivi stubići označavaju uzorke organa *in vitro* gajenih biljaka, adv. pupoljke i organogeni kalus. **rl** - listovi rozete biljaka koji su gajeni u uslovima *in vitro*, na hranljivoj podlozi bez dodatih regulatora rastenja (fotoperiod 16/8 h); **rk** - korenovi rozete biljaka koji su gajeni *in vitro*, na MS podlozi bez regulatora rastenja (fotoperiod 16/8 h); **kl** - klijanaci biljaka koji su

gajeni *in vitro*, na MS podlozi bez regulatora rastenja (fotoperiod 16/8 h); **apl** - adventivni pupoljci obrazovani na eksplantatima listova koji su gajeni *in vitro*, na MS podlozi bez dodatih RRB (fotoperiod 16/8 h); **apk** - adventivni pupoljci obrazovani na eksplantatima korenova koji su gajeni *in vitro*, na MS podlozi bez RRB (fotoperiod 16/8 h); **kk** - korenovi iz kulture korenova gajeni *in vitro*, na MS podlozi bez RRB (fotoperiod 16/8 h); **ok** - organogeni kalus indukovan na eksplantatima listova na MS podlozi sa dodatkom RRB 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU (fotoperiod 16/8 h); **aplh** - adventivni pupoljci obrazovani na eksplantatima listova gajenim na MS podlozi sa 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU (fotoperiod 16/8 h); **ek** - embriogeni kalus indukovan na eksplantatima listova na MS podlozi sa 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU (mrak); **gse** - globularni somatski embrioni indukovani na eksplantatima listova na MS podlozi sa 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU (mrak); **kse** – kotiledonarni somatski embrioni indukovani na eksplantatima listova na podlozi sa 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU (mrak); **pcl** – listovi cvetalih biljaka iz prirode; **pck** – korenovi cvetalih biljaka iz prirode; **pcs** - stabljike cvetalih biljaka iz prirode; **pnc** - nezreli, zatvoreni cvetovi biljaka iz prirode; **pzc** - zreli, otvoreni cvetovi biljaka iz prirode. Objašnjenja skraćenica gena navedena su u **Tabeli 25**.

Geni *CePR10* i *CeTLP1-like*, koji pretpostavljeno imaju ulogu u odbrani od patogena, takođe su bili podvrgnuti RT-qPCR analizi (**Slika 36.**, **Slika 37.**). *CePR10* je najaktivniji u **ek**, nakon čega se njegova ekspresija postepeno smanjuje u **gse**, i posebno u **kse** i adv. pupoljcima (**apl**, **aplh**, **apk**) gde pada na nivo kontrole ili ispod. Ekspresija *CePR10* u **ek** i **gse** je statistički značajno povećana u odnosu na kontrolu. Ovaj gen takođe pokazuje visoku ekspresiju u korenovima iz *in vitro* kultre i prirode (statistički značajno u **kk** i **pck**). Posebno se ističe ekspresija u korenovima iz prirode (**pck**), koja je slična kao u **ek**, imajući u vidu da je u svim ostalim organima iz prirode ekspresija na nivou kontrole ili niža. Transkripcija gena *CeTLP1-like* se aktivira u uzorcima *in vitro* uz dodatak 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU, što za posledicu ima statistički značajno povećanu ekspresiju u embriogenim tkivima (**ek**, **gse**, **kse**), organogenom kalusu (**ok**) i adv. pupoljcima na listu (**aplh**) u poređenju s kontrolom (**Slika 36.**). Najveća razlika u ekspresiji primećena je u **kse** sa ≈ 32 puta većom ekspresijom u odnosu na kontrolu. Za razliku od uzoraka koji su indukovani *in vitro* uz dodatak RRB, u spontano formiranim adv. pupoljcima na listu i korenu, ekspresija je u nivou kontrole ili niža. Treba napomenuti da je zabeležena relativno visoka ekspresija *CeTLP1-like* gena u uzorcima organa iz prirode, pri čemu je statistički značajna ekspresija u odnosu na kontrolu zapažena u korenovima (**pck**) i u stabljikama (**pcs**) (**Slika 36.**). Ekspresija gena *CeACS3* je značajno veća u **ek** u odnosu na kontrolu lista i ostala embriogena tkiva (**gse i kse**, **Slika 36.**). Međutim, ekspresija u **ek** je na sličnom nivou kao i najviša zabeležena ekspresija u korenovima cvetalih biljaka (**pck**), koja se izdvaja u odnosu na ostale uzorke iz prirode, u kojima je *CeACS3* uglavnom slabo eksprimiran. Statistički značajno veća ekspresija u odnosu na kontrolu takođe je uočena u uzorku **apk** (**Slika 36.**).

CeYUC7 je snažno aktivan u klijancima (**kl**) i **kse** (statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolu), dok je njegova ekspresija drastično manja u **gse** i posebno u oba tipa kalusa (**ek** i **ok**). Osim toga, *CeYUC7* se slabo eksprimira u uzorcima organa iz prirode, u nivou kontrole ili niže (**Slika 37.**). Ekspresija *CeIAA32* se upadljivo razlikuje između uzoraka iz prirode i *in vitro* (**Slika 37.**). U uzorcima iz prirode, ekspresija ovog gena je veoma niska, nalazeći se u nivou kontrole ili čak niža. Nasuprot tome, najviša ekspresija *CeIAA32* je zabeležena u **kl** i **kse**, pri čemu su ove vrednosti slične i statistički značajno različite od većine ostalih tkiva. Približno visoka ekspresija zabeležena je još u **ok**. Pored **kse** i **ok**, i u drugim uzorcima koji su gajeni u prisustvu RRB je primećeno statistički značajno povećanje ekspresije u odnosu na kontrolu (**ek**, **gse** i **aplh**, **Slika 37.**). Statistički značajno povećanje ekspresije je takođe zabeleženo u uzorcima **rk** i spontano dobijenim adv. pupoljcima sa korena (**apk**). Gen *CeGH3.6* se najviše eksprimira u **kse**, sa statistički značajno povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu lista i ostala tkiva, osim **aplh**. Takođe, ovaj gen je aktivniji u svim tipovima pupoljaka (**apk**, **aplh**, **apl**), cvetovima (**pzc**, **pnc**) i klijancima (**kl**) u poređenju sa uzorcima listova i korenova, bilo da su gajeni *in vitro* ili iz prirode (**Slika 37.**).

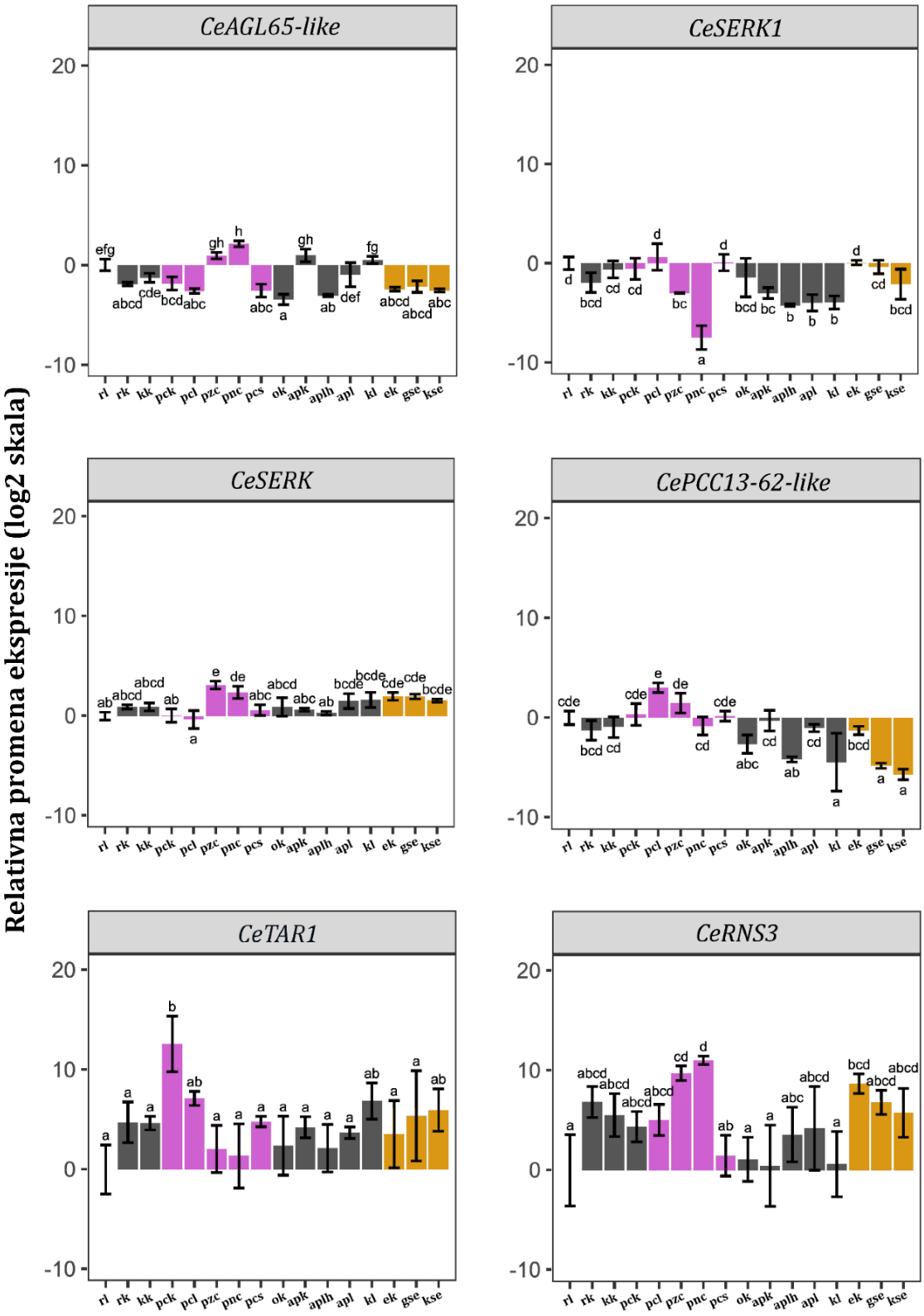


Slika 37. Ekspresioni profili genskih kandidata u kolekciji 16 tkiva kičice koji tokom SE pokazuju najveću ekspresiju tokom kasne faze formiranja **se**. Ružičasti stubići na graficima označavaju uzorke biljnih organa iz prirode, dok žuto obojeni stubići označavaju tkiva različitih stadijuma SE. Tamno sivi stubići označavaju uzorke organa *in vitro* gajenih biljaka, adv. pupoljke i organogeni kalus. Skraćenice tkiva i organa pojašnjene su na **Slici 36.**, a objašnjenja skraćenica gena navedena su u **Tabeli 25**.

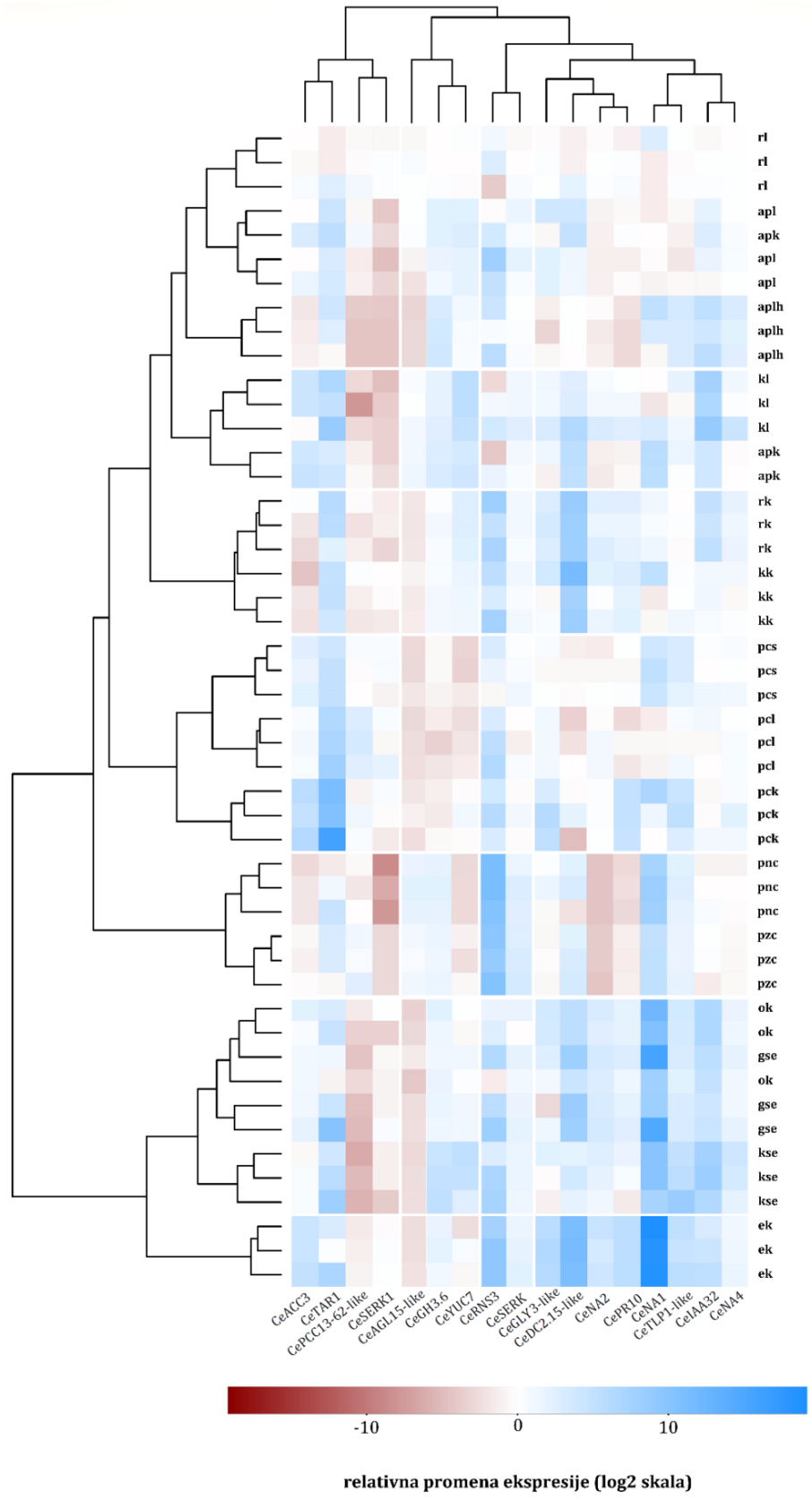
Neki od ispitivanih gena pokazuju nisku ekspresiju u svim ili određenim embriogenim tkivima, često ispod nivoa kontrolnog uzorka. Međutim, ovaj trend je najčešće primetan i u drugim tkivima. Ekspresije oba *SERK* gena odgovaraju očekivanim *FPKM* vrednostima. *CeSERK1*, na primer, pokazuje sniženu ekspresiju u većini testiranih tkiva (statistički značajno u **pzc**, **pnc**, **apk**, **aplh**, **apl** i **kl**). Izuzev u tkivu cvetova (**pzc** i **pnc**), niska ekspresija detektovana je u svim testiranim tkivima u slučaju drugog *SERK* transkripta, *CeSERK* (**Slika 38.**). Gen povezan sa procesom desikacije, *CePCC-62-like*, ne samo da u većini tkiva ima sniženu ekspresiju u odnosu na kontrolu, već je ta razlika najuočljivija (statistički značajna) u **kl**, **gse** i naročito **kse** (**Slika 38.**). *CePCC-62-like* je najaktivniji u uzorcima organa iz prirode, **pcl** i **pcz**. Slično njemu, *CeAGL65-like* pokazuje sniženu ekspresiju u odnosu na kontrolu lista u većini testiranih tkiva i ta razlika je statistički značajna u svim embriogenim tkivima (**ek**, **gse**, **kse**). Jedini uzorak u kome se primećuje statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolu su nezreli cvetovi iz prirode (**pnc**) (**Slika 38.**).

U ekspresiji gena *CeRNS3* i *CeTAR1* postoje značajne varijacije među biološkim ponavljanjima u većini testiranih uzoraka (**Slika 38.**). U slučaju gena *CeTAR1*, ove varijacije su dovele do gubitka većine statističkih značajnosti. Jedini uzorak u kome je uočeno statistički značajno povećanje ekspresije u odnosu na list rozete su korenovi cvetalih biljaka (**pck**). S druge strane, gen *CeRNS3* je najviše i ujednačeno eksprimiran u cvetovima (**pzc**, **pnc**), dok su se statističke značajnosti između ekspresija u ostalim tkivima izgubile zbog velikih varijansi u ekspresiji bioloških ponavljanja (**Slika 38.**).

Drugačiji prikaz varijacija ekspresije predstavljen je na toplotnoj mapi na kojoj su vizuelno prikazane korelacije odnosa između relativne ekspresije testiranih gena i 16 uzoraka tkiva (**Slika 39**). Kao kontrola u odnosu na koju su normalizovane ekspresije gena korišćen je uzorak listova rozeta (**rl**), koji su na mapi često bele boje, što ukazuje na nisku varijabilnost uzoraka. Geni i tkiva su klasifikovani u grupe na osnovu sličnosti, dok intenziteti boja ilustruju amplitudu ekspresije (crvena - snižena, plava - povišena u odnosu na kontrolu). Dendrogrami pružaju dodatne informacije o povezanosti između uzoraka i gena, omogućavajući sveobuhvatan pregled ekspresije testiranih gena. Embriogena tkiva su blisko pozicionirana (**Slika 39**). Naime, uzorci **ek** formiraju zasebnu grupu koja je blisko povezana sa drugim embriogenim tkivima, poput globularnih i kotiledonarnih **se**, uz uzorak **ok**. Uzorci iz prirode su raspoređeni u dve blisko povezane grupe, pri čemu jedna grupa obuhvata uzorke cvetova (**pnc** i **pzc**), dok se druga grupa sastoji od uzoraka listova (**pcl**), korenova (**pck**) i stabljiki (**pcs**), kako je prikazano na **Slici 39**.



Slika 38. Ekspresioni profili genskih kandidata u kolekciji 16 tkiva kičice koji tokom SE pokazuju sniženu ekspresiju u odnosu na kontrolu lista rozete (**rl**), ili čija ekspresija nije značajno promenjena u većini uzoraka. Ružičasti stubići na graficima označavaju uzorke organa biljaka iz prirode, dok žuto obojeni stubići označavaju tkiva različitih stadijuma SE. Tamno sivi stubići označavaju uzorke organa *in vitro* gajenih biljaka, adv. pupoljke i organogeni kalus. Skraćenice tkiva i organa pojašnjene su na **Slici 36.**, a objašnjenja skraćenica gena navedena su u **Tabeli 25**.



Slika 39. Toplotna mapa na kojoj su prikazani profili ekspresija 17 gena sa potencijalnom ulogom u SE u 16 uzoraka tkiva u kičici. Spektar od crvene do plave boje predstavlja log2 transformisanu promenu ekspresije u poređenju sa kontrolnim uzrokom lista rozete (**rl**); crvena i plava boja predstavljaju smanjeni, odnosno povećani nivo ekspresije, redom. Skraćenice tkiva i organa pojašnjene su na **Slici 36.**, a objašnjenja skraćenica gena data su u **Tabeli 25**.

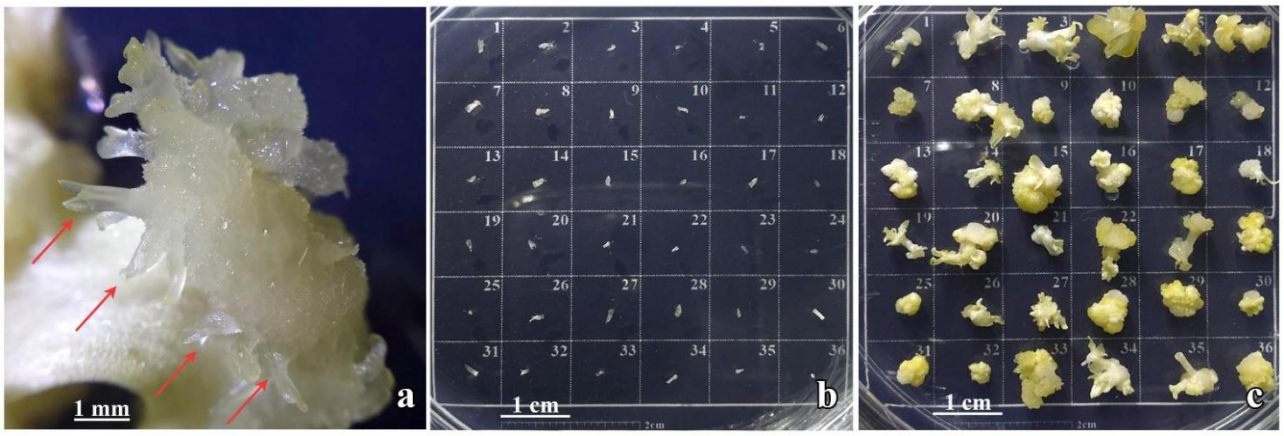
4.5. Sekundarna i ciklična somatska embriogeneza kod *C. erythraea*

4.5.1. Indukcija primarne SE na eksplantatima listova *C. erythraea* i eksperimentalna postavka u cilju indukcije sekundarne i cikične SE

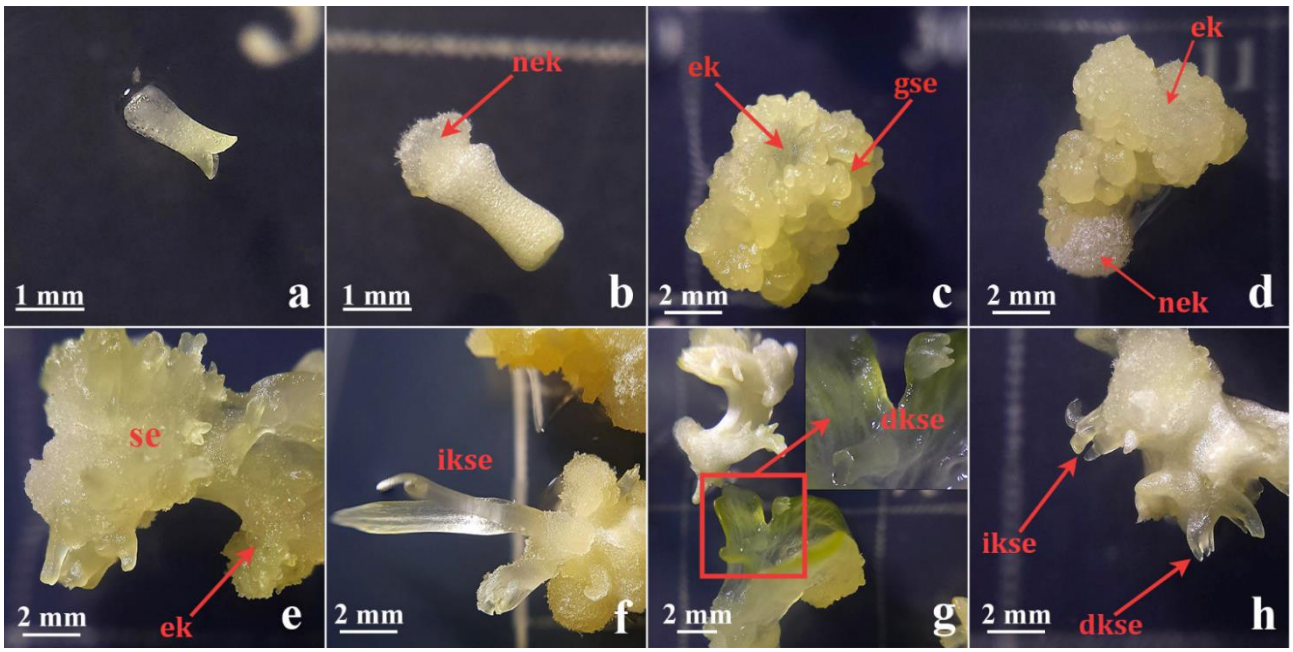
Uspešna indukcija SE postignuta je na eksplantatima listova kičice gajenim na MS podlozi sa 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mg^{-1} CPPU, gde se put razvića nastavlja preko ISE pod uslovom da se eksplantati listova drže u mraku (Filipović i sar. 2015, poglavlje 4.1.). U ovom eksperimentu, primarna SE je indukovana kako su opisali Filipović i sar. (2015), sa malim izmenama. Segmenti listova odraslih biljaka su gajeni tri nedelje u mraku na MS podlozi sa dodatkom 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU (**Slika 14.**). Dobro razvijeni primarni **kse** (**Slika 14.**, **Slika 40 a**) koji su se formirali na ovoj podlozi, korišćeni su kao primarni eksplantati za indukciju sekundarne SE na podlozi sa različitim koncentracijama 2,4-D i CPPU (**Slika 14.**). Generalno, u svim eksperimentima sekundarne i ciklične SE, samo su **kse** korišćeni kao eksplantati, iako su uočeni embrioni svih stadijuma razvića. Poređenja radi, eksplantati listova su takođe gajeni na podlozi sa dodatkom 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU, a primarni **kse** dobijeni u ovoj postavci su takođe korišćeni za indukciju sekundarne i ciklične SE.

4.5.2. Indukcija sekundarne SE

Dobro razvijeni primarni **kse** obrazovani na eksplantatima listova na 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU (**Slika 40 a**) su izolovani (**Slika 40 b**, **Slika 41 a**) i korišćeni kao eksplantati za indukciju sekundarne SE na istoj podlozi. Posle četiri nedelje, primarni eksplantati **kse** su se uvećali nekoliko puta i razvili i embriogeni (**ek**) i neembriogeni kalus (**nek**), kao i somatske embrione u različitim stadijumima razvića (**Slika 40 c**). Neembriogeni kalus koji se razvio na primarnim **kse** je bio vodenast, prskav i providan (**Slika 41 b**). Nasuprot tome, **ek** je pokazao organizovaniju strukturu i morfologiju: embriogeno tkivo je bilo polukompaktno, nodularno, glatke površine i beličaste do žućkaste boje (**Slika 41 c**, **41 d**, **41 e**). Sekundarni **se** su se formirali na primarnim **kse** kako indirektno, iz **ek** (**Slika 41 e**, **41 f**, **41 h**), tako i direktno na eksplantatu, bez kalusiranja (**Slika 41 g**, **41 h**). Somatski embrioni u kotiledonarnoj fazi formirani direktno ili indirektno se u daljem tekstu pominju kao **dkse** i **ikse**, redom. Iako je većina eksplantata nabubrila i značajno izmenila svoju morfologiju tokom gajenja, kod nekih eksplantata se može primetiti kako se **dkse** razvija na primarnim kotiledonima (**Slika 41 g.**).



Slika 40. Indukcija sekundarne SE kod *C. erythraea*. (a) primarni **kse** obrazovani na listovima eksplantata (crvene strelice); (b) primarni **kse** su izolovani i postavljeni kao eksplantati raspoređeni u nizovima 6 x 6 na MS podlozi sa 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU; (c) primarni **kse** sa indukovanim sekundarnim embrionima nakon četiri nedelje od postavke.

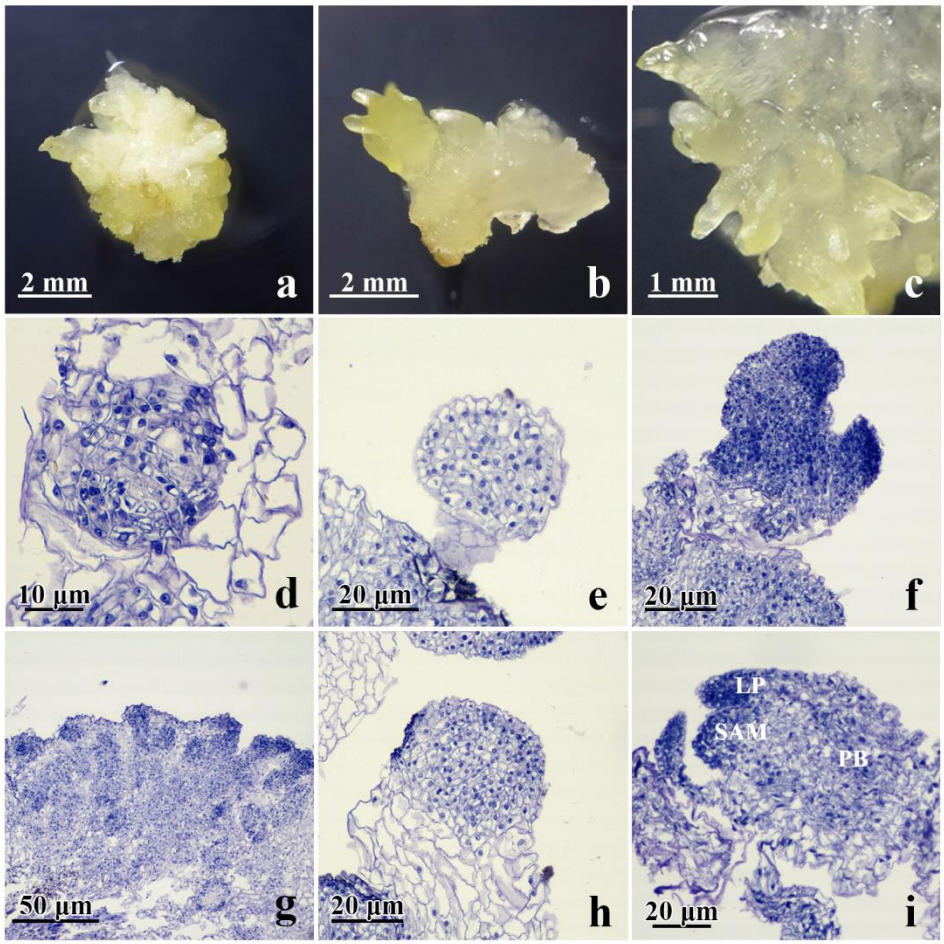


Slika 41. Sekundarna SE posle četiri nedelje u kulturi na podlozi sa 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU. (a) Primarni eksplantat – **kse** na početku eksperimenta; (b) **kse** sa formiranim samo neembriogenim kalusom (**nek**); (c) **kse** sa obrazovanim embriogenim kalusom (**ek**) i globularnim somatskim embrionom (**gse**); (d) **kse** koji je razvio i **ek** i **nek**; (e) **ek** sa sekundarnim **se** u različitim fazama razvića; (f) **ikse** nastao iz kalusa; (g) **dkse** indukovan na kotiledonima primarnih eksplantata **kse**; (h) **dkse** i **ikse** na istom eksplantatu. **kse** – kotiledonarni somatski embrion, **nek** – neembriogeni kalus, **ek** – embriogeni kalus, **gse** – globularni somatski embrion, **dkse** – kotiledonarni somatski embrion formiran direktno, **ikse** – kotiledonarni somatski embrion formiran indirektno.

4.5.3. Histologija sekundarne SE

Proces razvića sekundarnih **se** u kičici je histološki analiziran. Sekundarna SE je indukovana na eksplantatima listova na podlogama koje sadrže 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU. Morfološke karakteristike eksplantata sa direktno i/ili indirektno obrazovanim sekundarnim **se** u različitim fazama, koji su korišćeni za histološku analizu, prikazani su na **Slici 42 a**, **42 b** i **42 c**. Prisustvo **se** u različitim fazama razvića koji se mogu uočiti na istom eksplantatu sugeriše da je proces SE asinhron. Histološke karakteristike uočene tokom DSE sa korenova kičice (Subotić i sar. 2003, Subotić i Grubišić 2007) i ISE sa eksplantata listova (Filipović i sar. 2015) pomažu pri razlikovanju ova dva tipa SE, koji se javljaju istovremeno tokom sekundarne SE.

Direktna indukcija sekundarnih **se** je uočena na celoj površini primarnih **se**. Direktna inicijacija **se** je primećena na subepidermalnom sloju **kse** eksplantata bez međufaze kalusa. Diferencirane višećelijske PEM, uočene na periferiji eksplantata, dalje su se razvile u embrione (**Slika 42 d**). Tokom daljeg rasta, PEM su se razvile u sekundarne **se** u globularnoj fazi razvića. Prva jasno prepoznatljiva odlika diferencijacije somatskog embriona je **gse** na kome se vidi sloj sličan protodermu, kao začetak polarizacije (**Slika 42 e**). Ovi **gse** nisu imali očiglednu vaskularnu vezu sa primarnim tkivom **kse** sa kojim su povezani strukturom nalik na suspenzor (**Slika 42 e**). Dalji razvoj somatskih embriona podrazumevao je njihovo izduživanje, razviće prokambijuma i diferencijaciju meristema izdanaka, dostižući rani somatski embrion u kotiledonarnom stadijumu (**Slika 42 f**). Sekundarni **kse** su bili slabo pričvršćeni za površinu primarnih eksplantata i mogli su se lako odvojiti. Nisu primećene vaskularne veze između somatskih embriona u razvoju i primarnog eksplantata (**Slika 42 f**).



Slika 42. Morfološka i histološka karakterizacija sekundarne SE indukovane na primarnim eksplantatima **kse** gajenim četiri nedelje u mraku na podlozi sa dodatkom 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU. (a - c) Uočeni su brojni sekundarni **kse** koji su se formirali indirektno na **ek** i/ili direktno na primarnom eksplantatu; (d - f) proces sekundarne DSE; (g - i) proces sekundarne ISE; (d) obrazovane proembriogene ćelijske mase (PEM); (e) formiranje sekundarnog **gse** sa strukturom nalik na suspenzor na površini primarnog **kse**; (f) sekundarni **kse** u ranoj fazi razvoja; (g) embriogeni kalus formiran od malih i izodijametričnih skupina ćelija; (h) globularni somatski embrion formiran na **ek**; (i) sekundarni **kse** u kasnoj fazi razvića sa vidljivim apikalnim meristemom izdanaka (engl. *„Shoot apical meristem"* *SAM*), provaskularnim trakama (engl. *„Provascular bands"*, *PB*) i primordijama lista (engl. *„Leaf primordia"*, *LP*).

Kao što je primećeno pomoću svetlosne mikroskopije, **ek** se sastoji od malih i izodijametričnih skupina ćelija, koje sadrže istaknute nukleuse i gustu citoplazmu. Ovi klasteri su bili sferične strukture koja je ograničena slojem organizovanih ćelija. Histološke analize su pokazale da neke ćelije u površinskim delovima embriogenog kalusa ispoljavaju meristemske karakteristike (**Slika 42 g**). Ovi klasteri proembriogenih ćelija napredovali su kroz seriju organizovanih deoba da bi doveli do formiranja **gse** (**Slika 42 h**). Konačno, primećena je povećana diferencijacija i elongacija embriona, koji su postali oštriji, dostižući kasni **kse** sa dobro razvijenim apikalnim meristemom izdanaka, primordijama listova i provaskularnim trakama (**Slika 42 i**).

4.5.4. Efekat 2,4-D i CPPU na indukciju sekundarne SE

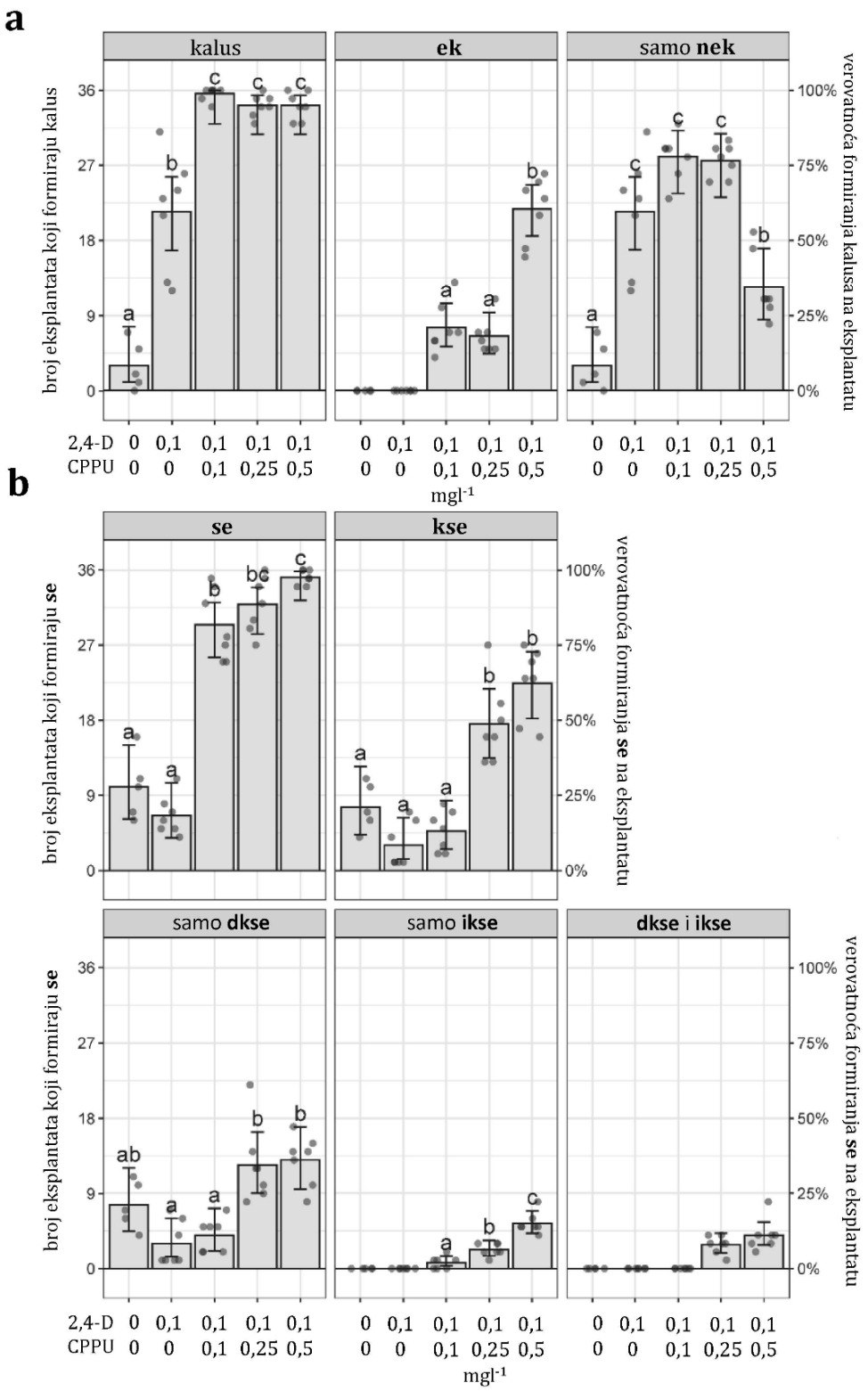
Kako bi se ispitao efekat različitih koncentracija 2,4-D i CPPU na proces sekundarne SE, dobro razvijeni primarni **kse** su izolovani sa eksplantata listova gajenih na 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU i preneti na sveže hranljive podloge sa različitim sadržajem RRB. U MS podlogu je

dodato 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i rastuće koncentracije CPPU (0 - 0,5 mgl^{-1}), dok je kao kontrola korišćena podloga bez regulatora rastenja (**Slika 14**, **Slika 43.**). Eksplantati **kse** su raspoređeni na petri kutijama (smatranim kao ponavljanja) u nizovima 6 x 6, tako da se svako od sedam ponavljanja sastojalo od 36 primarnih **kse** (**Slika 40 b**, **40 c**). Posle četiri nedelje u kulturi, svaki primarni **kse** je posmatran pod binokularnom lupom, a karakteristike kao što su formiranje kalusa (**ek** ili **nek**), i **se** u različitim fazama razvića (kotiledonarni ili drugi) i različitog porekla (direktno ili indirektno obrazovani), zabeleženi su kao broj eksplantata sa određenom karakteristikom.

Opšti regenerativni potencijal **kse** eksplantata na različitim podlogama inicijalno je evaluiran kao broj eksplantata koji formiraju kalus. Na podlozi bez RRB, u proseku samo 3 od 36 eksplantata su formirala kalus, isključivo **nek**, dok nijedan eksplantat nije formirao **ek** (**Slika 43 a**). Na eksplantatima **kse** gajenim na 0,1 mgl^{-1} 2,4-D, u proseku je oko 60% eksplantata obrazovalo kalus, ali opet, svi su bili **nek**. Međutim, ako su oba regulatora rastenja dodata u podlogu, skoro svi **kse** (u proseku 34,14 - 35,57 eksplantata po tretmanu) su generisali kalus, čak i pri najnižoj koncentraciji CPPU od 0,1 mgl^{-1} (**Slika 43 a**), zbog čega je CPPU bio neophodan za generisanje **ek**. Najveći broj eksplantata sa **ek** se formirao na koncentraciji od 0,5 mgl^{-1} CPPU (21,71 u proseku) (**Slika 43 a**).

Iako se na primarnim eksplantatima gajenim na podlozi bez CPPU nije obrazovao embriogeni kalus, sekundarni **se** su se pojavili u proseku na oko 10 (od 36) eksplantata na MS podlozi (bez RRB), a na 6,57 eksplantata gajenih na 0,1 mgl^{-1} 2, 4-D (**Slika 43 b**). Očigledno, u odsustvu **ek**, svi sekundarni **se** formirani na ovim podlogama su se razvijali direktno. Spontana sekundarna DSE je prikazana na **Slici 44 a**. Sa dodatkom CPPU, broj eksplantata koji obrazuju **se** se drastično povećao u zavisnosti od koncentracije CPPU, do u proseku 35,14 eksplantata na podlozi sa dodatkom 0,5 mgl^{-1} CPPU (**Slika 43 b**). Embrioni u kotiledonarnom stadijumu su dalje klasifikovani u embrione formirane direktno i indirektno (**dkse** i **ikse**), i pokazalo se da DSE nije samo dominantan put razvića na podlogama bez CPPU, već i glavni način razvića na podlogama koje sadrže CPPU (**Slika 43 b**). Međutim, broj eksplantata sa embrionima koji se formiraju putem ISE blago se povećao sa porastom koncentracije CPPU, do u proseku 5,43 eksplantata na podlozi sa 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU (**Slika 43**, „samo **ikse**"), u skladu sa većom indukcijom **ek** na ovoj podlozi (**Slika 43 a**).

Pored toga, broj **kse** po eksplantatu je takođe zabeležen nakon četiri nedelje gajenja na različitim podlogama (**Tabela 28.**). Prosečan broj **kse** po eksplantatu bio je značajno veći na podlogama koje sadrže 0,25 i 0,5 mgl^{-1} CPPU u poređenju sa drugim podlogama, dostižući do 3,87 ± 0,50 novih sekundarnih **kse** po primarnom eksplantatu (**Tabela 28.**).

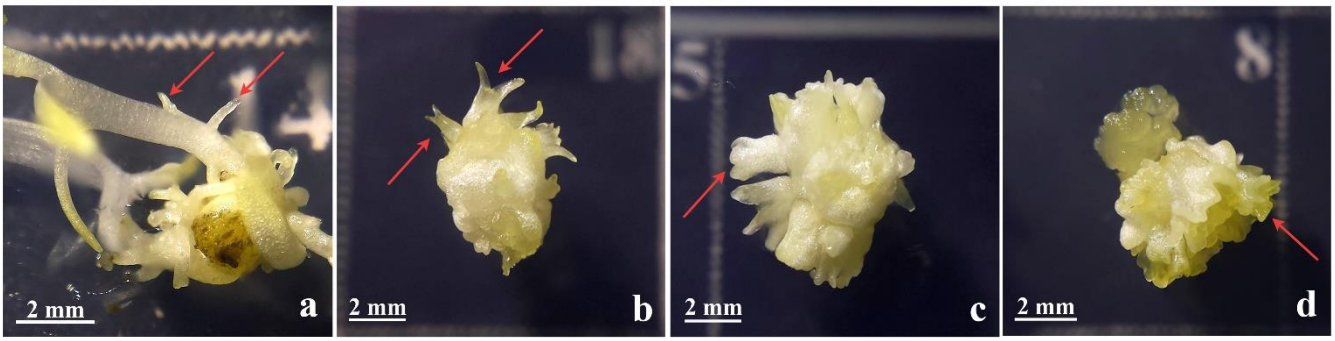


Slika 43. Uticaj različitih koncentracija 2,4-D i CPPU na indukciju kalusa i sekundarnih embriona na eksplantatima **kse**. (a) Broj eksplantata **kse** koji formiraju bilo koju vrstu kalusa i posebno embriogeni (**ek**) ili neembriogeni (**nek**) kalus; (b) broj eksplantata **kse** koji formiraju sekundarne embrione bilo kog stadijuma ili porekla (**se**) i posebno kotiledonarne somatske embrione (**kse**), formirane direktno (**dkse**) ili indirektno (**ikse**). Srednje vrednosti za sedam ponavljanja (sa po 36 eksplantata **kse**) ekvivalentne prilagođenim vrednostima odgovarajućih modela logističke regresije, sa greškama (95% intervala poverenja), predstavljene su kao broj eksplantata koji formiraju specifične tipove kalusa ili **se** (leva ordinata), ili verovatnoća formiranja kalusa ili **se** na eksplantatima (desna ordinata). Različita slova označavaju statistički značajne razlike pri $p < 0,05$. Sive tačke predstavljaju pojedinačna ponavljanja (petri kutije).

Tabela 28. Uticaj sastava podloge na prosečan broj formiranih sekundarnih **kse** po primarnom eksplantatu. Razmatrani su samo eksplantati koji su formirali **kse**. Prikazane su srednje vrednosti ± SD po tretmanu. Različita slova ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) prema *Tukey post-hoc* poređenju parova. SD – standardna devijacija.

2,4-D (mgl^{-1})	CPPU (mgl^{-1})	kse po eksplantatu
0	0	1,43 ± 0,44 [a]
0,1	0	1,18 ± 0,37 [a]
0,1	0,1	1,61 ± 0,54 [a]
0,1	0,25	3,28 ± 0,71 [b]
0,1	0,5	3,87 ± 0,50 [b]

Indukcijom sekundarne SE na različitim podlogama formirali su se **kse** različite morfologije. Sekundarni **se** obrazovani spontano i direktno na primarnim eksplantama na podlozi bez RRB, uglavnom u zoni hipokotila eksplantata, bili su pravilne morfologije (**Slika 44 a**). Koncentracija 0,1 mgl^{-1} 2,4-D sa 0,25 mgl^{-1} CPPU dovela je do formiranja dobro razvijenih bikotiledonalnih **kse** (**Slika 44 b**), koji su se lako izolovali sa primarnog eksplantata (i stoga bili poželjniji kao eksplantati za novi ciklus SE, poglavlje 4.5.5.). Sekundarni **kse** indukovani na kombinacijama sa višom koncentracijom CPPU (0,5 mgl^{-1} CPPU) često su bili neprirodne morfologije, poput **kse** sa više od dva kotiledona, trubastog ili fascikularnog oblika sa spojenim kotiledonima (**Slika 44 c**, **44 d**).



Slika 44. Morfologija sekundarnog **kse** (crvene strelice) koji se formira na različitim kombinacijama regulatora rastenja: (a) podloga bez regulatora rastenja; (b) 0,1 mgl^{-1} 2,4-D sa 0,25 mgl^{-1} CPPU; (c), 0,1 mgl^{-1} 2,4-D sa 0,5 mgl^{-1} CPPU i (d) 0,2 mgl^{-1} 2,4-D sa 0,5 mgl^{-1} CPPU.

4.5.5. Indukcija ciklične SE

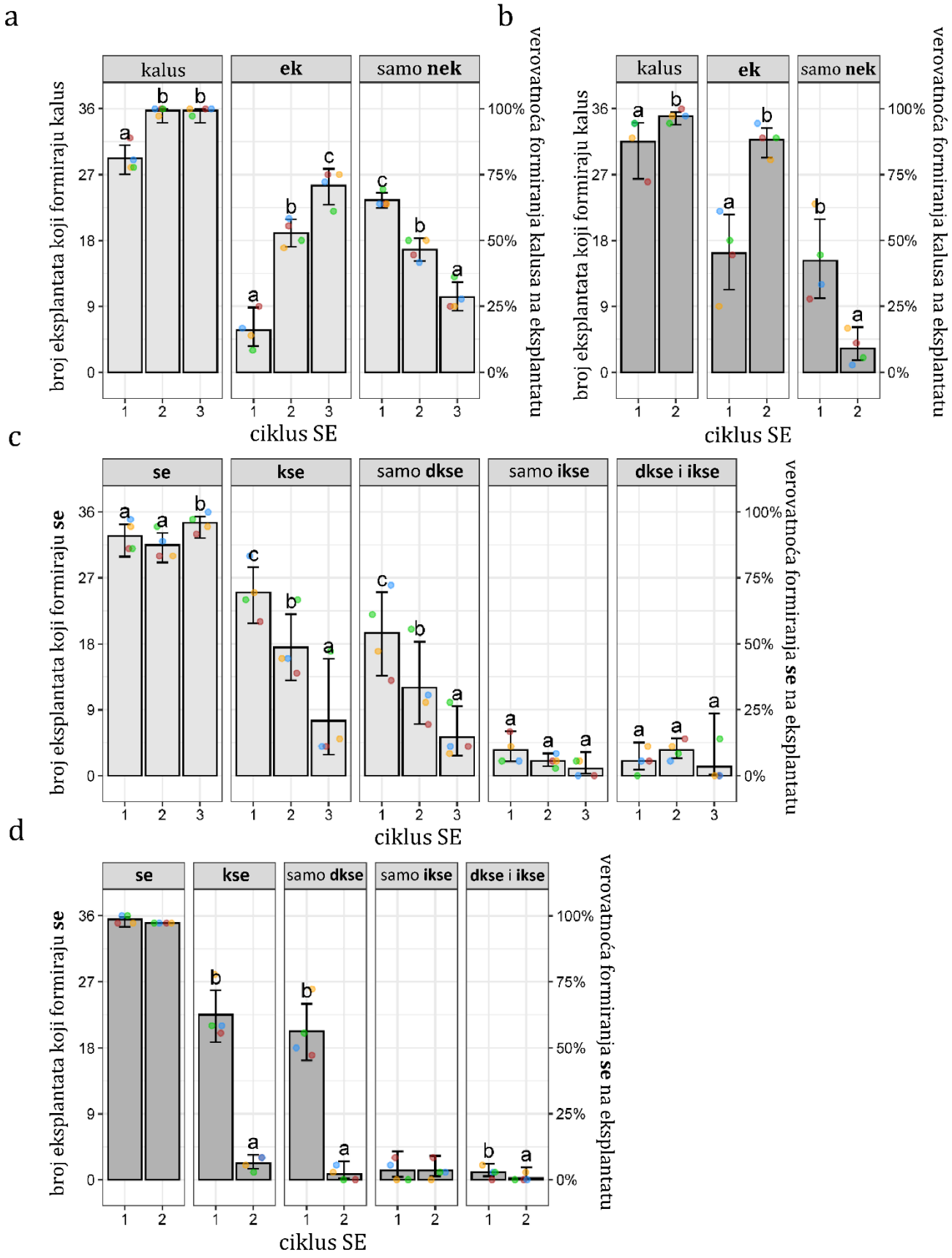
Kako bi se ispitalo da li SE može da se nastavi kroz nekoliko ciklusa, testirane su dve kombinacije regulatora rastenja: 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU i 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU, navedene u daljem tekstu kao niže i više koncentracije, redom. Ove dve kombinacije su održavane tokom trajanja eksperimenta, počevši od indukcije SE na eksplantatima listova (**Slika 14.**). Četiri ponavljanja (petri kutije) koja su korišćena u ovom eksperimentu su bila povezana kroz cikluse u smislu da su embrioni obrazovani u jednom ciklusu prebačeni u petri kutiju sa istom oznakom u narednom ciklusu. Eksplantati su postavljani u nizovima 6 x 6, što znači da je maksimalan broj eksplantata sa nekim karakteristikama (kalus ili **se**) bio 36 po ponavljanju. Pošto je najveći broj eksplantata koji formiraju **se** ili **kse** (**Slika 43 b**), kao i najveći broj **kse** po eksplantatu (**Tabela 28.**), dobijen na 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 ili 0,5 mgl^{-1} CPPU, niža koncentracija CPPU je korišćena u kombinaciji sa 2,4-D (0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU), jer su embrioni obrazovani na ovoj podlozi bili pravilne morfologije (**Slika 44 b**). S druge strane, više koncentracije oba RRB, ali u istom odnosu (0,2 mgl^{-1} 2,4-D sa 0,5 mgl^{-1} CPPU) su se pokazale

kao optimalne za indukciju SE u kulturi listova kičice (Filipović i sar. 2015) i iz tog razloga su takođe korišćene u ovom eksperimentu. Sakupljeni su samo **kse** i postavljeni da započnu sledeći ciklus.

U prvom ciklusu ciklične SE, sekundarni **kse** koji su se razvili na primarnim eksplantatima **kse** na podlogama sa nižom ili višom koncentracijom RRB su izolovani i prebačeni na svežu podlogu istog sastava i zabeležene su njihove morfološke karakteristike (formiranje kalusa i embriona) posle četiri nedelje u kulturi. U drugom ciklusu, tercijarni **kse** koji su se obrazovali nakon četiri nedelje su prebačeni na istu svežu podlogu za treći i poslednji ciklus (**Slika 14.**). Kao što se može videti na **Slici 45**, ciklična SE je mogla da se indukuje na obe kombinacije RRB; međutim, jedino SE na nižim koncentracijama može napredovati kroz tri ciklusa, dok su dva ciklusa bila moguća na višim koncentracijama.

Na hranljivoj podlozi sa nižim koncentracijama auksina i citokinina, u proseku 29,25 eksplantata **kse** je obrazovalo neku vrstu kalusa tokom prvog ciklusa, dok su skoro svi eksplantati (35,75 u proseku) generisali kalus tokom drugog i trećeg ciklusa (**Slika 45 a**). Slično, broj eksplantata koji formiraju kalus se povećao u drugom ciklusu u poređenju sa prvim ciklusom na višoj koncentraciji RRB (**Slika 45 b**). Embriogeni kapacitet eksplantata, određen kao broj eksplantata **kse** sa indukovanim **ek**, takođe se značajno povećao sa progresijom ciklusa na obe vrste hranljivih podloga. Konkretno, broj eksplantata koji formiraju **ek** na 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU se povećao kroz cikluse sa 5,75 eksplantata (po ponavljanju) u prvom ciklusu na 25,5 eksplantata u trećem ciklusu (**Slika 45 a**), dok je na 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU, 16,25 i 31,75 eksplantata generisalo **ek** u prvom i drugom ciklusu, redom (**Slika 45 b**). U oba slučaja, ovo povećanje je bilo istovremeno sa smanjenjem broja eksplantata koji formiraju samo **nek** (**Slika 45 a**, **45 b**).

Formiranje **se**, kao još jednog parametra regenerativnog kapaciteta eksplantata se nije mnogo menjalo tokom ciklusa, pošto su skoro svi eksplantati formirali **se** na obe vrste podloga (**Slika 45 c**, **45 d**). Na nižoj koncentraciji RRB, došlo je do blagog (iako statistički značajnog) povećanja broja eksplantata koji formiraju **se** u trećem ciklusu u poređenju sa prva dva ciklusa (**Slika 45 c**), dok su pri višoj koncentraciji skoro svi eksplantati razvili **se** u oba ciklusa (**Slika 45 d**). Međutim, broj kompletno formiranih embriona u kotiledonarnoj fazi drastično se smanjio sa progresijom ciklusa i pri nižim i višim koncentracijama regulatora rastenja. Tako se broj eksplantata sa obrazovanim **kse** smanjio sa 25 u prvom na 7,5 u trećem ciklusu i sa 22,5 u prvom na samo 2,25 u drugom ciklusu na nižim i višim koncentracijama, redom (**Slika 45 c**, **45 d**). Uzimajući u obzir samo eksplantate koji su formirali **kse**, prosečan broj novoformiranih **kse** po eksplantatu nije se značajno razlikovao među različitim ciklusima SE i različitim koncentracijama, i bio je ≈ 3 u svim slučajevima (podaci nisu prikazani). To znači da je u drugom ciklusu pri višoj koncentraciji nastalo manje od 10 **kse**, što je bilo nedovoljno za pokretanje trećeg ciklusa. Ukupno, na 432 **kse** koji su korišćeni kao eksplantati na nižim koncentracijama (4 ponavljanja x 36 eksplantata po ponavljanju x 3 ciklusa) se obrazovalo ukupno 634 novoformirana dobro razvijena **kse** u svim ciklusima, dok se na 288 **kse** gajenih na višim koncentracijama regulatora rastenja (4 ponavljanja x 36 eksplantata po ponavljanju x 2 ciklusa) formiralo ukupno 280 **kse**. Većina **kse** se formirala direktnim putem na obe hranljive podloge i u svim ciklusima (**Slika 45 c**, **45 d**).

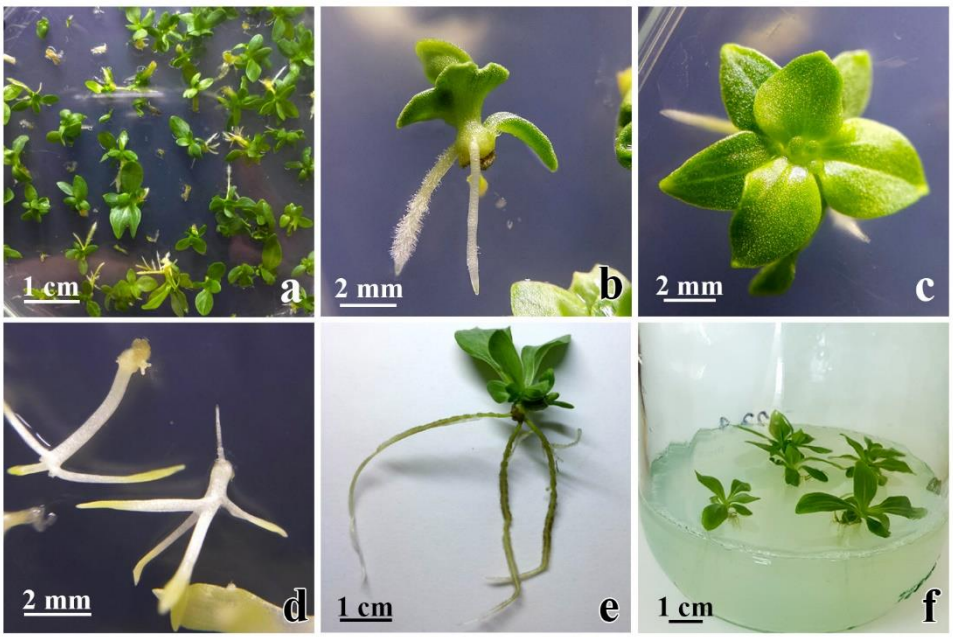


Slika 45. Uticaj ciklusa sekundarne SE i sastava podloge na indukciju kalusa i sekundarnih embriona na eksplantatima. (a) i (c) Eksplantati gajeni na nižim koncentracijama regulatora rastenja (0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU); (b) i (d) eksplantati gajeni na višim koncentracijama regulatora rastenja (0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU); (a) i (b) broj **kse** eksplantata koji formiraju bilo koju vrstu kalusa i posebno embriogeni (**ek**) ili neembriogeni (**nek**) kalus; (c) i (d) broj **kse** eksplantata koji formiraju sekundarne

embrione bilo kog stadijuma ili porekla (**se**) i posebno kotiledonarne somatske embrione (**kse**), formirane direktno (**dkse**) ili indirektno (**ikse**). Srednje vrednosti za četiri ponavljanja (sa po 36 eksplantata **kse**), ekvivalentne prilagođenim vrednostima odgovarajućih modela opštih jednačina za estimaciju sa greškama (interval poverenja od 95%), predstavljene su kao broj eksplantata koji formiraju specifične tipove kalusa ili **se** (leva ordinata), ili kao verovatnoća formiranja kalusa ili **se** na eksplantatima (desna ordinata). Tačke iste boje predstavljaju povezana ponavljanja (petri kutije) kroz cikluse. Različita slova označavaju statistički značajne razlike pri $p < 0,05$.

4.5.6. Klijanje sekundarnih somatskih embriona

Sposobnost sekundarnih **kse**, formiranih na podlogama sa 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU, da klijaju i razviju se u klijance, a zatim i cele biljke, ispitivana je na svetlu i u mraku na podlogama bez RRB. Na svetlosti, na 80% eksplantata su se obrazovali dobro razvijeni izdanci sa više listova (**Slika 46 a**, **46 b**, **46 c**), dok je 32,4% ovih klijanaca razvilo koren posle 25 dana u kulturi (**Slika 46 b, 46 c**). Dobro razvijene i ukorenjene mlade biljke (**Slika 46 e**) su se razvile u odrasle biljke nakon prenošenja na svežu podlogu (**Slika 46 f**). Činilo se da je većina biljaka zdrava i da snažno raste. U mraku, 64,5% eksplantata **kse** razvilo je etiolirane izdanke pri čemu su se na nekim spontano obrazovali **kse** (**Slika 46 d**) i većina tih izdanaka je takođe formirala korenove.



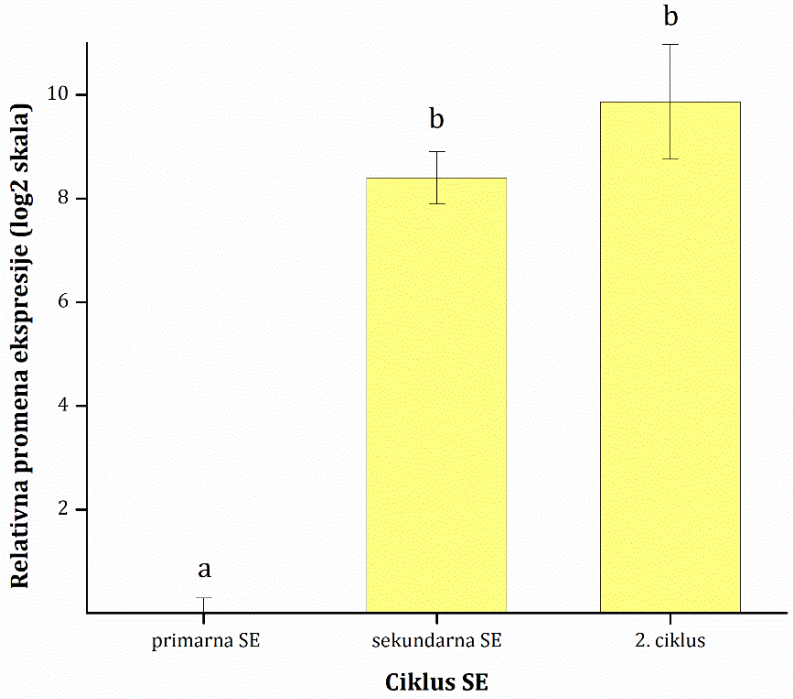
Slika 46. Klijanje sekundarnih **kse** na podlozi bez regulatora rastenja. (a-c) Većina proklijalih sekundarnih **kse** na svetlosti je imala dobro razvijene izdanke i neke od njih su formirale korenove; (d) kada se sekundarni **kse** postavi da klija u mraku, formiraju se korenovi i etiolirani izdanci; (e) biljka sa dobro razvijenim korenom nakon 40 dana; (f) biljke prebačene na MS radi daljeg rasta.

4.5.7. Ekspresija *CeNA1* gena tokom ciklične SE

Ekspresija *CeNA1* gena je evaluirana u embriogenom tkivu koje se formiralo nakon četiri nedelje u kulturi na podlozi sa dodatkom 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU. Embriogeno tkivo je bilo mešovitog sastava, sa različitim udelom embriogenog kalusa (**ek**) i **se** u globularnom i kotiledonarnom stadijumu. Uzorak embriogenog tkiva je sakupljen sa eksplantata listova primarne SE i dva ciklusa ciklične SE. Za normalizaciju je upotrebljena aritmetička sredina ekspresija *RPL2* i *TBP1* gena sa dokazano najstabilnijom ekspresijom u skupu uzoraka

somatske embriogeneze (poglavlje 4.3.), a rezultati su predstavljeni u vidu relativne promene genske ekspresije u odnosu na kontrolni uzorak tkiva iz primarne SE (**Slika 47.**).

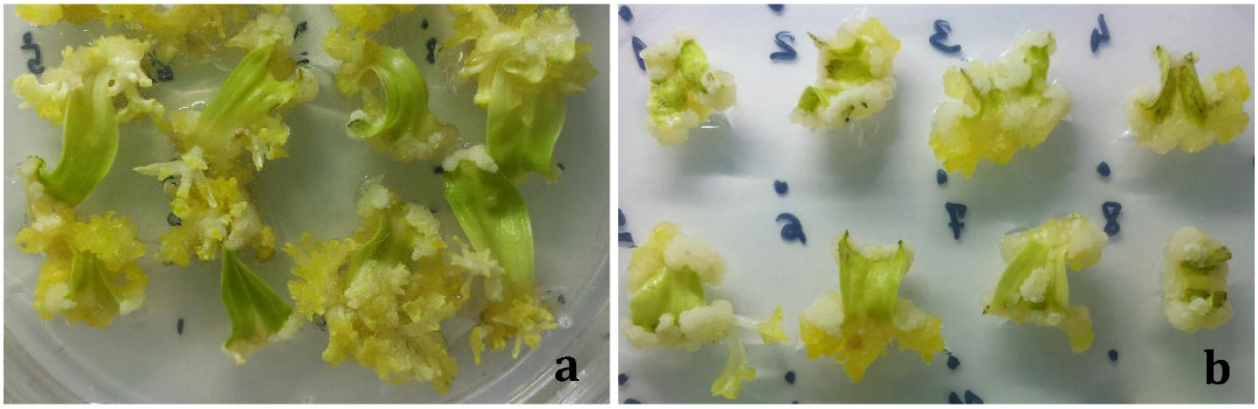
Najizraženije promene u ekspresiji gena *CeNA1* uočene su prilikom upoređivanja primarne i sekundarne SE (**Slika 47.**). Ekspresija gena *CeNA1* statistički značajno se povećava u embriogenom tkivu tokom sekundarne SE i nakon toga ostaje relativno stabilna.



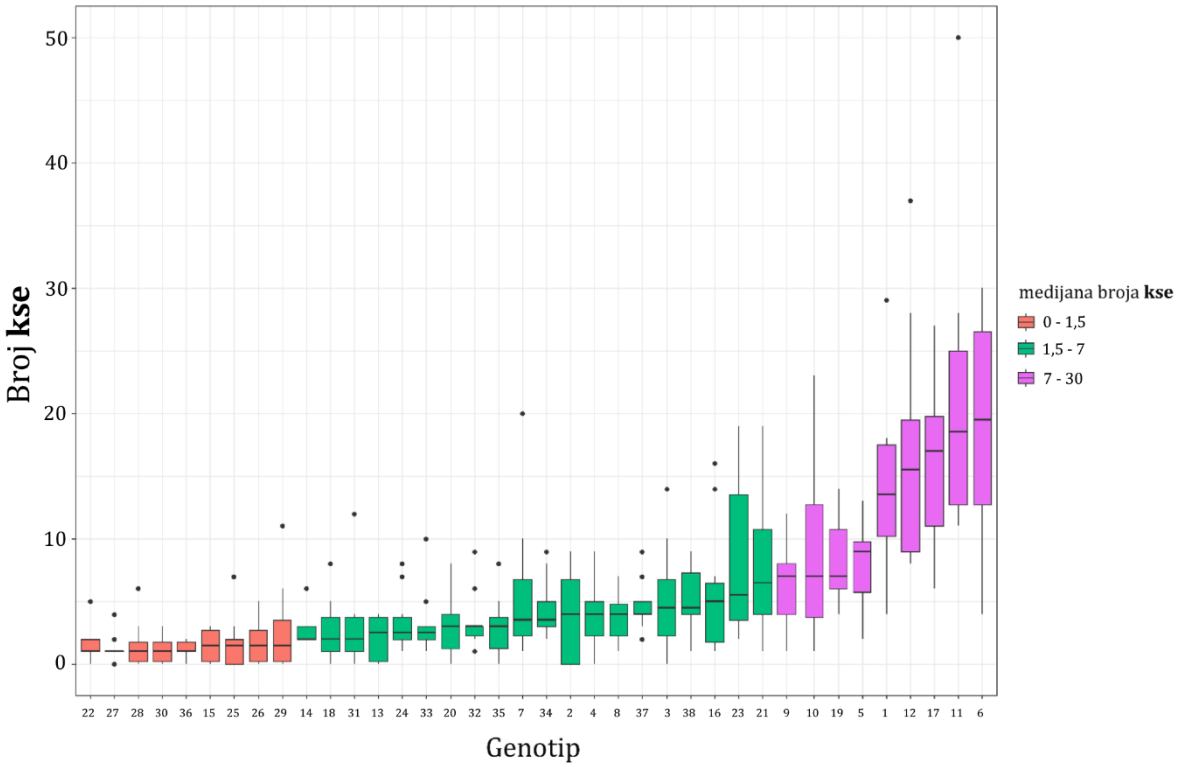
Slika 47. Ekspresija *CeNA1* gena u embriogenom tkivu poreklom iz primarne i dva ciklusa ciklične SE na podlozi sa dodatkom 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU. Kao kontrolni uzorak je korišćeno embriogeno tkivo iz primarne SE. Srednja vrednost i standardne greške relativne genske ekspresije prikazane su za tri biološka ponavljanja, a različitim slovima na grafiku su označene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu pri $p < 0,05$.

4.6. Evaluacija uticaja genotipa na regenerativnu sposobnost embriogenog kalusa i ekspresije odabranih gena u embriogenom tkivu genotipova sa različitom regenerativnom sposobnošću

Tokom manipulacije biljnim materijalom *in vitro*, primećeno je da se genotipovi kičice razlikuju u kapacitetu za diferencijaciju **ek** u embrione u kotiledonarnom stadijumu. Naime, neki genotipovi su pokazali sposobnost formiranja velikog broja **kse** (**Slika 48 a**), dok su drugi genotipovi razvili manje ili čak nijedan **kse** tokom istog vremenskog perioda (**Slika 48 b**). Radi ispitivanja uticaja genotipa na kapacitet **ek** za formiranje **kse**, primarna SE je indukovana na eksplantatima listova 38 različitih genotipova (biljaka) na podlozi sa 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU. Različiti parametri razvića, kao što je prisustvo **ek** i broj formiranih **kse** po eksplantatu, evaluirani su nakon četiri nedelje. Tokom ovog perioda svi eksplantati su formirali **ek** (rezultati nisu prikazani). Međutim, broj novoformiranih **kse** na **ek** je bio veoma varijabilan, sa medijanom koja se kretala u rasponu od 1 do 30 **kse** po eksplantatu (**Slika 49**.). Genotipove je prema tome bilo moguće podeliti u tri kategorije: genotipovi sa visokom regenerativnom sposobnošću **ek** (sa 7-30 **kse** po eksplantatu), dok su preostali genotipovi svrstani u srednju (**kse** < 7) i grupu sa niskim kapacitetom sa manje od 1,5 **kse** po eksplantatu (**Slika 49.**).



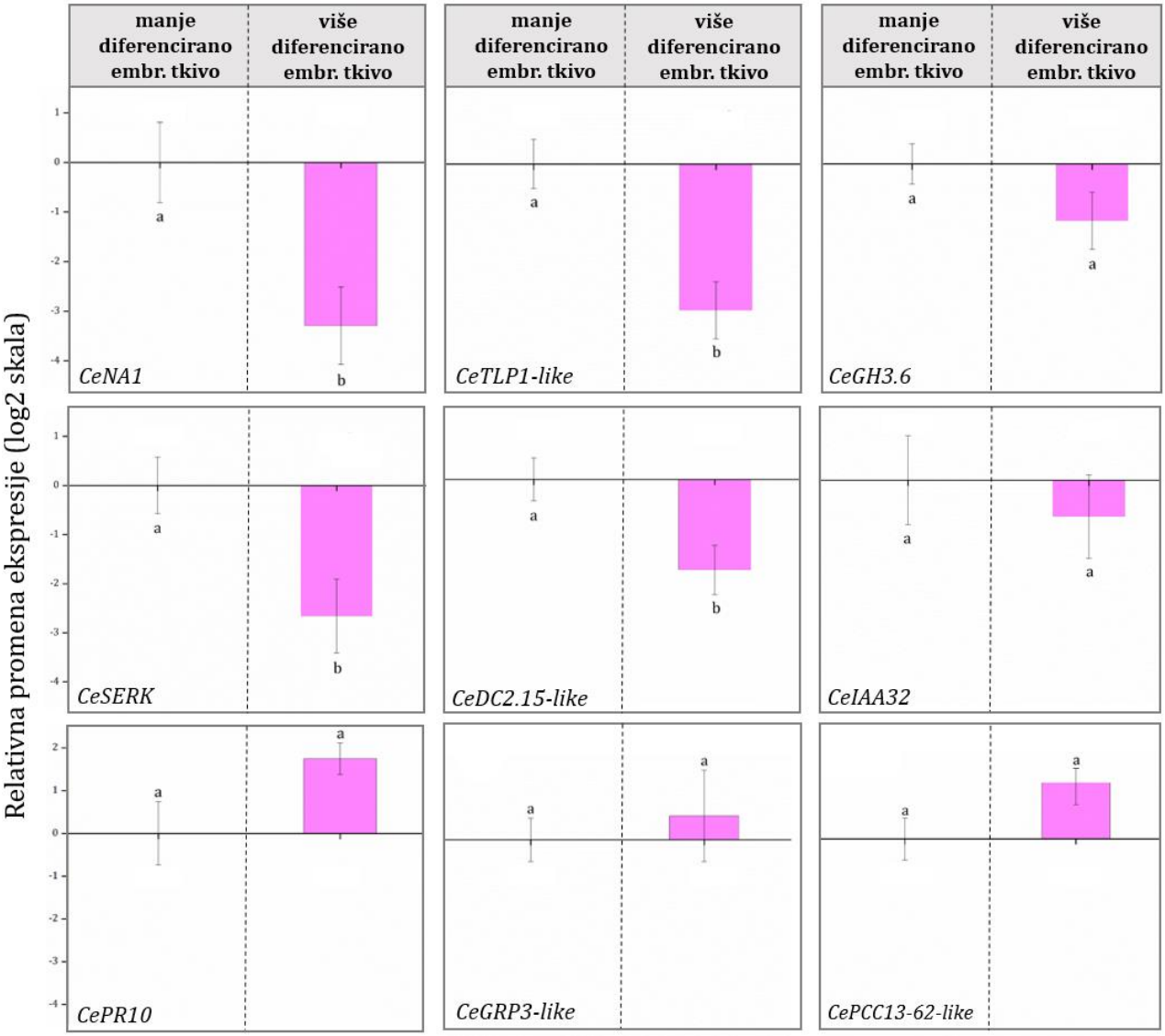
Slika 48. Eksplantati listova sa embriogenim tkivom koje se obrazovalo na MS podlozi sa dodatkom 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU nakon četiri nedelje u kulturi. (a) Embriogeno tkivo biljke koja produkuje veliki broj **se**; (b) embriogeno tkivo biljke koja produkuje manji broj **se**.



Slika 49. Broj **kse** u zavisnosti od genotipa. Genotipovi su poređani po medijani. „*Whisker*" označava minimalnu i maksimalnu vrednost medijane broja **kse**, dok tačke izvan te granice predstavljaju autlajere. Crveni i ljubičasti boks dijagrami označavaju genotipove koji su odabrani za dalji eksperiment.

Za analizu ekspresije gena, a radi lakše vizuelizacije razlika, odabrani su genotipovi sa niskim i visokim potencijalom za formiranje **kse** (crveni i ljubičasti boks dijagrami na **Slici 49**.). Ekspresija je evaluirana u uzorcima listova pre indukcije SE, i četiri nedelje od indukcije SE u uzorcima mešovitog embriogenog tkiva (**ek** i **se** svih stadijuma razvića) i ostataka listova nakon uklanjanja embriogenog tkiva. Embriogeno tkivo genotipova sa niskim potencijalom za formiranje **kse** je sadržalo veći udeo **ek** u odnosu na **se** bilo kog stadijuma (posebno **kse**), odnosno bilo je manje diferencirano (**Slika 48 b**). Embriogeno tkivo genotipova sa većom regenerativnom sposobnošću **ek** je sadržalo veći broj novoformiranih **kse**, te je dostiglo veći stepen diferenciranosti (**Slika 48 a**). Za eksperiment je odabran subset od devet gena koji su na osnovu *FPKM* vrednosti identifikovani kao DEG u transkriptomu (**Tabela 5.**). Kao što je i bilo

očekivano na osnovu *FPKM* predviđanja, veliki broj uzoraka listova pre tretmana i nakon četiri nedelje od indukcije SE nije imao očitanu ekspresiju (**Prilog 1.**), s obzirom na to da su geni inicijalno birani sa *FPKM* vrednošću nula ili blizu nule u listovima rozete (**rl**). S obzirom na to, ekspresiju je bilo moguće analizirati samo u embriogenom tkivu. Ekspresija je normalizovana u odnosu na manje diferencirano embriogeno tkivo, a kao referentni geni korišćeni su *RPL2* i *TBP1*. Rezultati su pokazali da je ekspresija većine gena u dve klase genotipova obrnuto korelisana sa diferenciranošću embriogenog tkiva (**Slika 50.**). Taj pad u ekspresiji je najizraženiji kod *CeNA1*, a još je statistički značajan kod *CeTLP1-like*, *CeDC2.15-like* i *CeSERK*. Jedino se kod *CePR10*, *CeGRP3-like* i *CePCC13-62-like* uočava rast ekspresije sa porastom broja **kse**, mada on nije statistički značajan.



Slika 50. Relativna promena ekspresije odabranih genskih kandidata u odnosu na stepen diferenciranosti embriogenog tkiva. Ekspresija gena u tkivu sa većim stepenom diferenciranosti je normalizovana u odnosu na ekspresiju u genotipovima sa niskim stepenom diferenciranosti, odnosno sa najvećim brojem **kse** po eksplantatu. Korišćeni su referentni geni *RPL2* i *TBP1*. Rezultati su analizirani pomoću *ANOVA* testa praćenog *Tukey post-hoc* testom sa vrednošću $p < 0,05$.

4.7. Kloniranje *CeNA1 amiRNA* konstrukata

Među genima sa potencijalnom ulogom u SE, naročito je interesantan ekspresioni profil transkripta *CeNA1* koji se najviše eksprimira u embriogenom kalusu, koja postepeno opada prateći tok sazrevanja embriona (**Slika 36.**). Radi bliže karakterizacije ovog gena i buduće transformacije biljaka kičice, napravljeni su konstrukti za utišavanje *CeNA1*. Ovi konstrukti su dizajnirani tako da introdukuju specifične kratke molekule RNK, *amiRNA*, koji na postranskripcionom nivou zauzimaju konformaciju ukosnice koja sprečava translaciju željenog proteina putem posttranskripcionog mehanizma RNK interferencije.

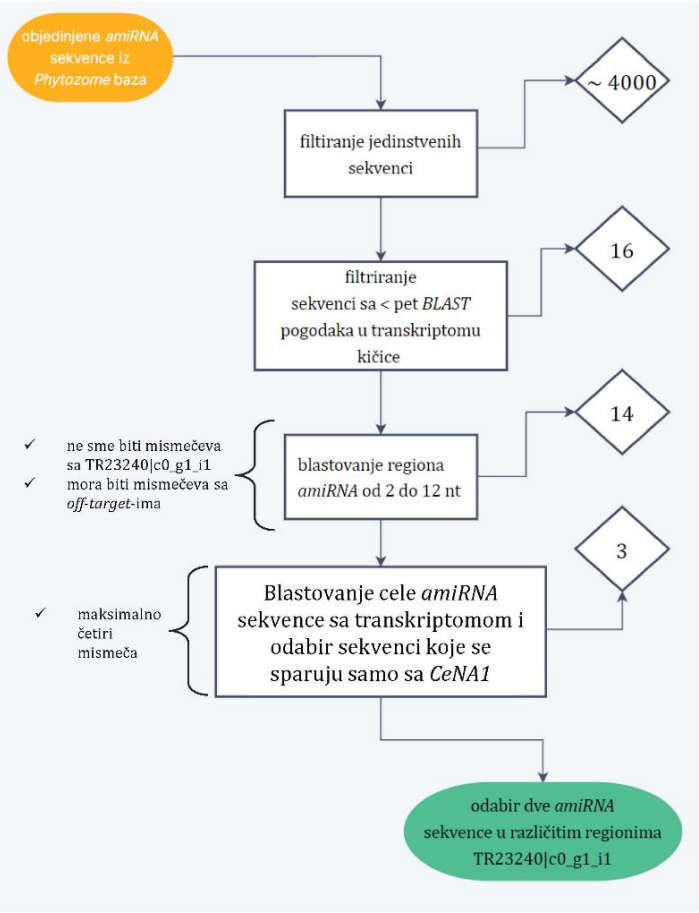
4.7.1. Dizajniranje i konstrukcija vektora za utišavanje gena

AmiRNA sekvence specifične za transkript *CeNA1* (TR23240|c0_g1_i1, 725 bp), konstruisane su na *WMD3* veb-sajtu. Budući da sekvenca transkripta nije bila dostupna u bazi veb-sajta, u odgovarajući deo koji se odnosi na željeni gen, ubačena je sekvenca transkripta u .FASTA formatu. Specifičnost svakog *amiRNA* kandidata je optimizovana kroz ponovljene runde predviđanja *off-target*-a koristeći anotirane transkripte iz svih 19 dostupnih baza iz kolekcije *Phytozome*. Prediktovane *amiRNA* sekvence su objedinjene i njima je dalje manipulisano u programskom jeziku R u cilju identifikacije najspecifičnijih kandidata za *CeNA1*. Redosled radnji u R-u je sažeto prikazan na **Slici 51**.

Nakon eliminacije dupliranih sekvenci generisano je ~ 4000 potencijalnih *amiRNA* sekvenci za *CeNA1*. Ove sekvence su zatim podvrgnute *BLAST* analizi sa transkriptomom kičice, koristeći E vrednost od E^{-41} i izdvojeno je 16 sekvenci koje imaju manje od pet *BLAST* pogodaka. Daljom analizom, blastovanjem regiona *amiRNA* od 2-12 nt, koji je najvažniji za ispravno sparivanje sa *CeNA1* transkriptom, ustanovljeno je da dve sekvence imaju više od dva *off-target*-a, te su one isključene iz dalje analize.

U sledećem koraku, blastovana je cela sekvenca preostalih 14 kandidata *amiRNA*, a zatim su izdvojene sekvence koje imaju maksimalno četiri mismeča u odnosu na sekvence transkriptoma. Od ovih sekvenci, ustanovljeno je da se tri sekvence sparuju samo sa *CeNA1*, te da nemaju pretpostavljene *off-target*-e u transkriptomu. Od te tri sekvence, izabrane su dve za utišavanje *CeNA1* (*CeNA1 amiRNA 1* i *CeNA1 amiRNA 2*), koje se nalaze u različitim regionima *CeNA1* transkripta (**Slika 52.**). Sekvence odabranih *amiRNA* i pozicije mismečeva u odnosu na TR23240|c0_g1_i1 prikazane su u **Tabeli 29**. Pozicije 1, 16/17 i 20/21 na sekvencama su introdukovani mismečevi prema propozicijama *WMD3* veb-sajta radi efikasnosti i zauzimanja konformacije sa „trbušastim" ispupčenjima.

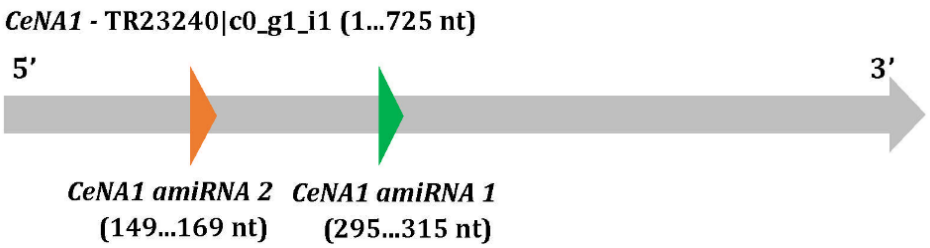
CeNA1 amiRNA fragmenti su konstruisani sa *pRS300* vektora serijom preklapajućih *Phusion* PCR reakcija, kada su *miR319a* (*sense*) i *miR319a** (*antisense*) sekvence zamenjene *CeNA1 amiRNA* i *CeNA1 amiRNA** sekvencama (**Slika 53.**). Prajmeri za odabrane sekvence (**Tabela 11.**) su konstruisani koristeći modul *Oligo* na *WMD3* veb-sajtu, na osnovu sekvenci *amiRNA* i vektora *pRS300*. Prilikom dizajna prajmera, algoritam automatski dodaje odgovarajuće mismečeve kako bi se postiglo optimalno savijanje konstrukta u obliku ukosnice. *AmiGatewayA* i *B* su modifikovani dostupni prajmeri za *pRS300* vektor koji omogućavaju da se sklopljen konstrukt uklonira u vektor *Gateway* metodom. Nakon svake reakcije, DNK amplikoni su vizuelizovani pod UV svetlom nakon elektroforeze na agaroznom gelu (**Slika 54.**). Trake su potom pažljivo isečene i prečišćene od agaroznog gela, izmerena je koncentracija DNK, a DNK nakon poslednje preklapajuće reakcije, u kojoj je sintetisan ceo *amiRNA* konstrukt, ubačena je u *Gateway* vektor.



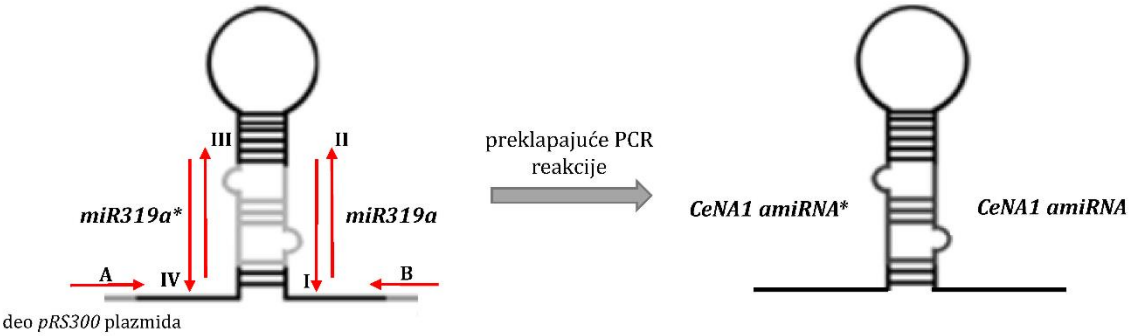
Slika 51. Proces izdvajanja najspecifičnijih *amiRNA* sekvenci za utišavanje *CeNA1* u R-u.

Tabela 29. Odabrane sekvence *CeNA1 amiRNA 1* i *CeNA1 amiRNA 2* sa naznačenim pozicijama mismečeva u odnosu na transkript TR23240|c0_g1_i1.

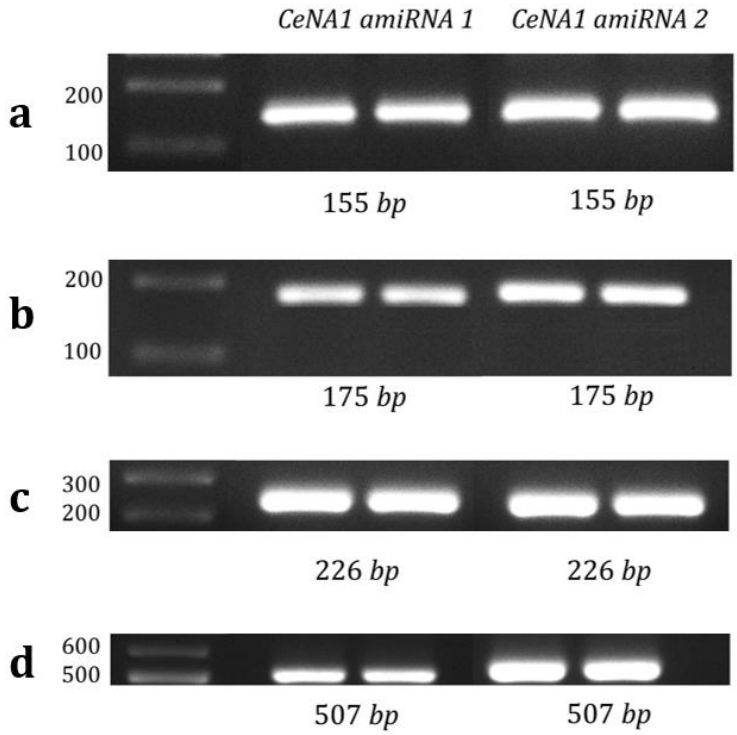
Ime	Sekvenca	Pozicija mismečeva (nt)
CeNA1 amiRNA 1	TAGTCGCCTCCGTAGCGACTT	1, 17, 20
CeNA1 amiRNA 2	TCCTACGATCGGTGCCTGCAC	1, 16, 21



Slika 52. Mesta vezivanja *amiRNA* sekvenci za *CeNA1* kodirajuću sekvencu TR23240|c0_g1_i1. Ilustracija je napravljena pomoću *ApE* alata.

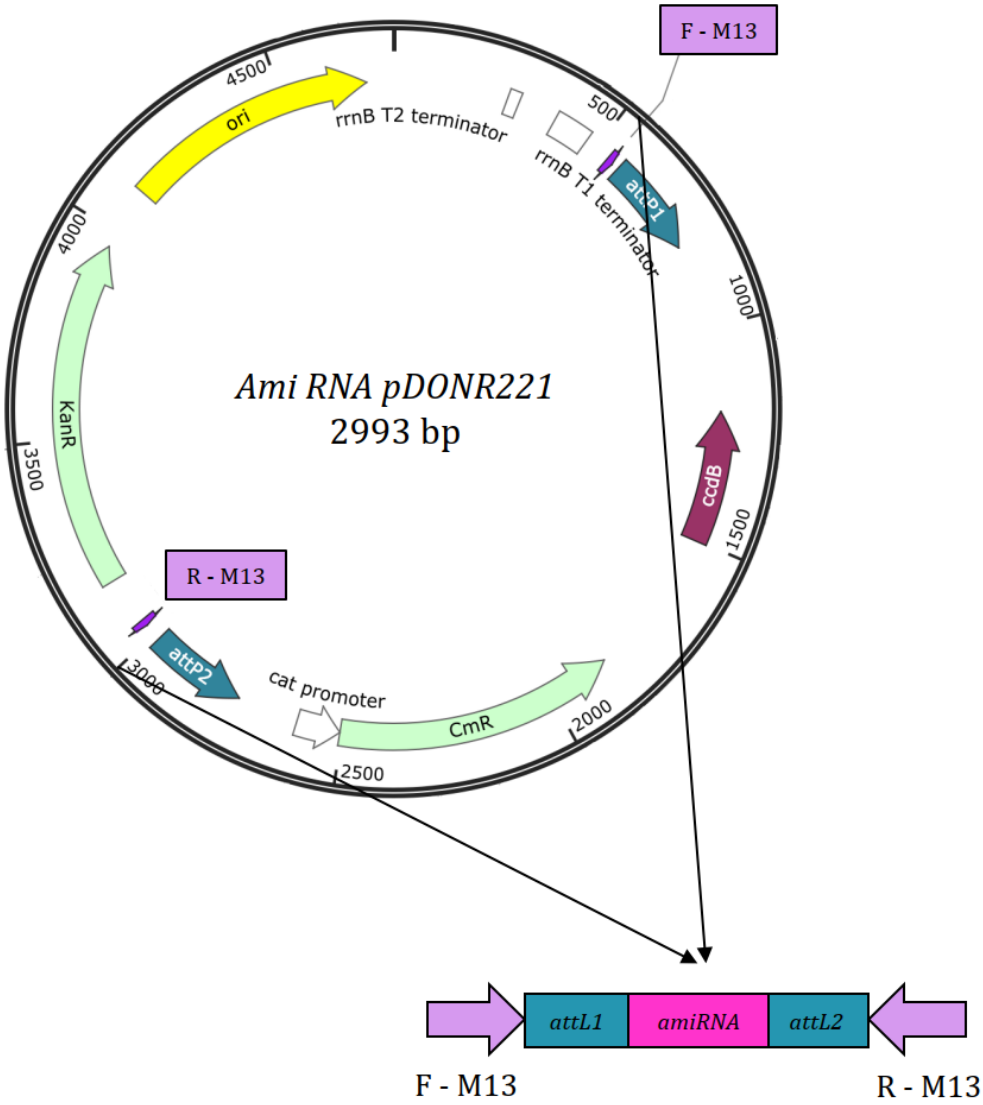


Slika 53. Zamena *miR319* fragmenta na vektoru *pRS300 CeNA1 amiRNA* fragmentom preklapajućim PCR reakcijama. Crvene strelice predstavljaju korišćene prajmere (I-IV; *Gateway A* i *B*).



Slika 54. Produkti preklapajućih PCR reakcija. Slova **a-d** označavaju amplifikaciju istoimenih DNK fragmenata.

DNK finalnog amplikona je u *Gateway BP* reakciji rekombinovana sa DNK *pDONR227* plazmida, čime su dobijeni ulazni klonovi sa *CeNA1 amiRNA* insertima (**Slika 55.**). Ulazni vektori su dalje elektroporacijom ubačeni u kompetentne *E. coli XL-1 Blue* ćelije radi umnožavanja i selekcije pravilno rekombinovanih vektora, a selekcija kolonija obavljena je na *LB* medijumu sa kanamicinom. Po sedam rezistentnih kolonija od obe *CeNA1 amiRNA* je testirano kolonijskim PCR-om pomoću M13 prajmera kako bi se dokazalo postojanje inserta odgovarajuće dužine (507 nt).



Slika 55. Ulazni klon sa *amiRNA* insertom. *AmiRNA* insert se rekombinacijom u *BP* reakciji ubacuje između *attP* mesta na *pDONR227* vektoru.

Po šest kolonija sa intezivnom trakom odgovarajuće dužine od obe *CeNA1 amiRNA* je poslato na sekvenciranje radi provere tačnosti kloniranja. Poravnavanjem *in silico* ukloniranih *amiRNA* inserta u *pDONR227* i rezultata sekvenciranja potvrđena je uspešna integracija obe *amiRNA* u vektor u svim kolonijama, na očekivanoj poziciji i sa ispravnom sekvencom (**Slika 56.**). Osim toga, u svim kolonijama u obe *amiRNA* otkrivena je tačkasta mutacija u *attL Gateway* mestu na 616. nukleotidu. Činjenica da je mutacija prisutna u svim sekvenciranim kolonijama sugeriše da ona nije posledica greške u sekvenciranju, već da se verovatno razlikuju *in silico* sekvenca *pDONR227* vektora i stvarna sekvenca kupljenog vektora. Za nastavak eksprimenta je izabrana po jedna kolonija od obe *CeNA1 amiRNA* čija je uspešnost potvrđena na sekvenciranju.

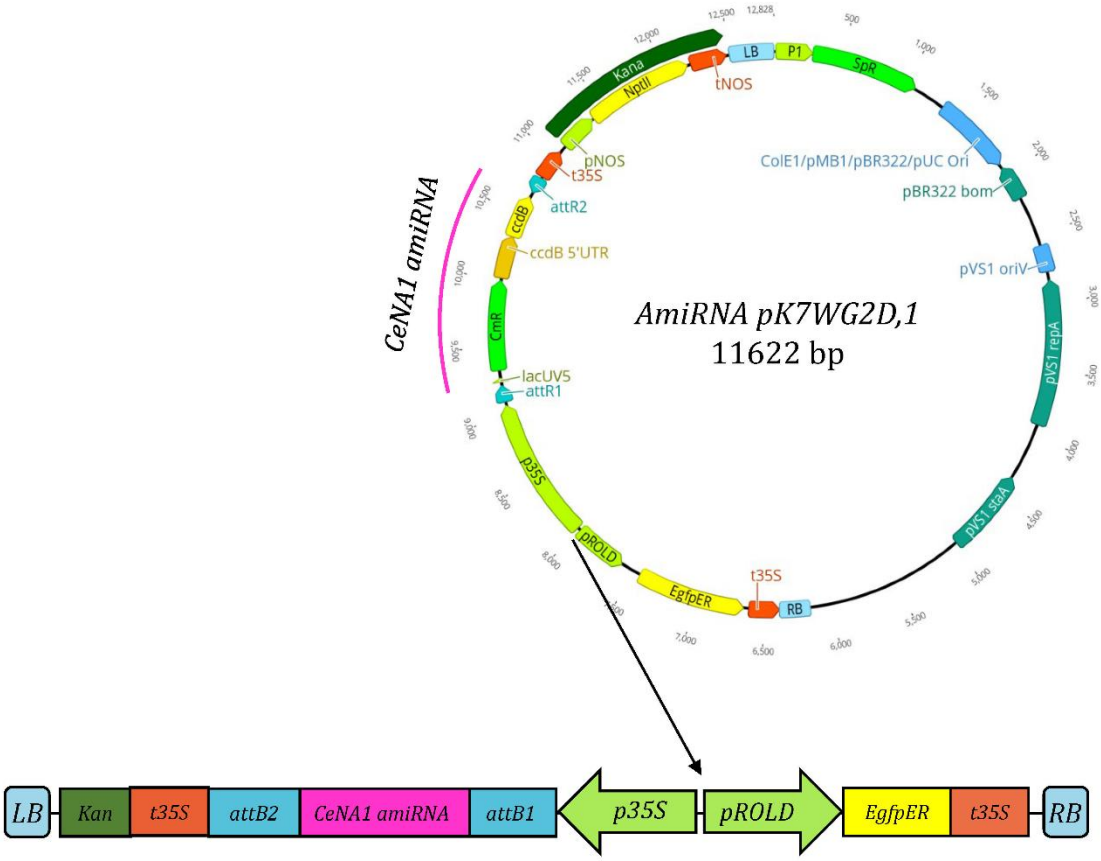
923 – 943 nt TAGTCGCCTCCGTAGCGACTT *CeNA1 amiRNA 1* u *pDONR221* (*in silico*)
TAGTCGCCTCCGTAGCGACTT *CeNA1 amiRNA 1* u *pDONR221* (sekvenciranje sa F - M13)
TAGTCGCCTCCGTAGCGACTT *CeNA1 amiRNA 1* u *pDONR221* (sekvenciranje sa R -T7 *promoter*)

772 – 792 nt AAATCGCTACGGACGCGACTT *CeNA1 amiRNA 1** u *pDONR221* (*in silico*)
AAATCGCTACGGACGCGACTT *CeNA1 amiRNA 1** u *pDONR221* (sekvenciranje sa F - M13)
AAATCGCTACGGACGCGACTT *CeNA1 amiRNA 1** u *pDONR221* (sekvenciranje sa R -T7 *promoter*)

616 nt
TTCGTTGCAACACATTGATGAGCAATG deo *attL* mesta u *pDONR221* (*in silico*)
TTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATG deo *attL* mesta u *pDONR221* (sekvenciranje sa F - M13)
TTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATG deo *attL* mesta u *pDONR221* (sekvenciranje sa R -T7 *promoter*)

Slika 56. Upoređivanje sekvenci *in silico* kloniranja *CeNA1 amiRNA 1* u *pDONR221* vektor sa rezultatima sekvenciranja nakon *BP* reakcije. Za sekvenciranje su korišćeni prajmeri F - M13 (direktni) i R - T7 *promoter* (reverzni). Prikazani su rezultati za odabranu bakterijsku koloniju *CeNA1 amiRNA 1. In silico* kloniranje je urađeno pomoću alata *ApE.*

Plazmidna DNK odabranih kolonija je u *Gateway LR* reakciji rekombinovana sa ciljnim vektorom *pK7WG2D,1*, kada nastaje ekspresioni klon za transformaciju biljaka (**Slika 57.**). Plazmidi su elektroporacijom ubačeni u *E. coli XL-1 Blue* kompetentne ćelije i umnoženi, a zatim je na odabranim kolonijama rezistentnim na spektinomicin urađen kolonijski PCR - prvo sa *AmiGatewayA* i *B* prajmerima radi potvrde inserta, a zatim i sa M13 prajmerima kako bi se utvrdilo odsustvo *pDONR227* sekvence.



Slika 57. Binarni vektor *pK7WG2D,1* sa ubačenim *NA1 amiRNA* insertom. *AmiRNA* insert je rekombinacijom ubačen između *attR* mesta na vektoru.

Potvrđeni binarni vektori su elektroporacijom prebačeni u soj *GV3101 A. tumefaciens* i umnoženi, a kolonijskim PCR-om je potvrđen insert pomoću prajmera *AmiGatewayA* i *B.* Na taj način su dobijeni gotovi vektori za genetičku transformaciju kičice pomoću *A. tumefaciens* koji nose vektore za utišavanje *CeNA1*. Dobijanjem transgenih biljaka kičice biće omogućeno praćenje potencijalnih efekata isključivanja ekspresije *CeNA1* na razne aspekte SE i fenotip transgenih biljaka.

4.8. *In silico* analiza gena i proteina CeNA1

U toku izrade ove doktorske disertacije, kao rezultat zajedničkog projekta više istraživačkih grupa sa Odeljenja za fizologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković", sekvenciran je genom diploidnog varijeteta *C. erythraea* Rafn. Podaci sekvenciranog genoma su iskorišćeni za identifikaciju sekvenci *CeNA1* gena i njima odgovarajućih proteinskih sekvenci koje su dalje analizirane. *In silico* analiza gena obuhvatila je predviđanje moguće strukture *CeNA1* gena, uključujući koordinate egzona, introna i netranslirajućih elemenata. Osim toga, analizirani su promotori gena kako bi se identifikovali specifični motivi i familije TF koje se za njih vezuju. TF su detaljnije opisani dodeljivanjem *GO* termina. *In silico* analiza proteina podrazumevala je predviđanje terminalnog signala na N-kraju, određivanje unutraćelijske lokalizacije i predikciju tercijarne strukture proteina.

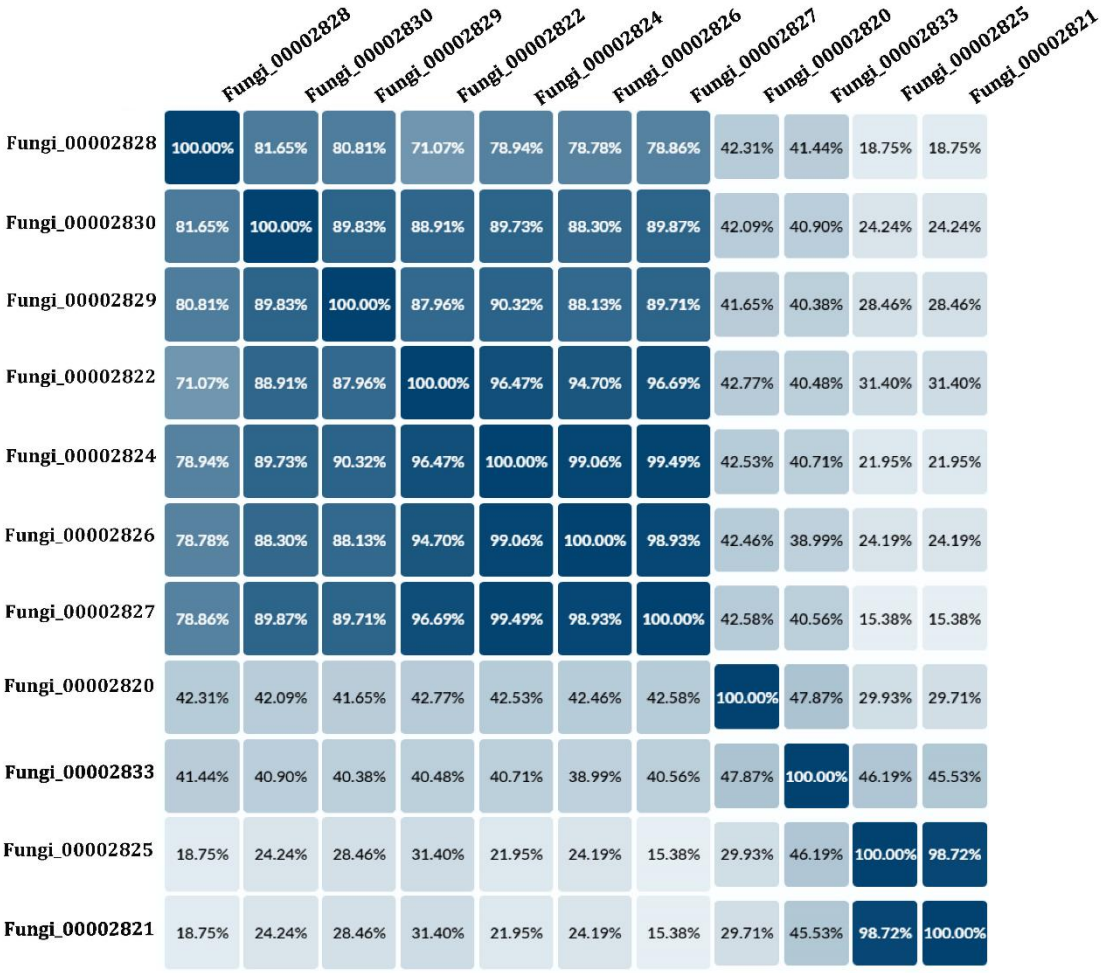
4.8.1. Karakteristike gena *CeNA1*

Mapiranjem sekvence *CeNA1* transkripta TR23240|c0_g1_i1 na genom kičice ustanovljeno je da u genomu postoji 11 *CeNA1* gena i da se svi nalaze na istom kontigu 96S. Po podrazumevanoj postavci platforme za sekvenciranje genoma, svi anotirani geni u nazivu sadrže prefiks „Fungi", što nije povezano sa vrstom sekvenciranog uzorka. U **Tabeli 30.** su date dužine *CeNA1* gena koje se kreću u opsegu od 468 bp za Fungi_00002821 do 8962 bp za Fungi_00002820.

Tabela 30. Dužine *CeNA1* gena nađenih u genomu kičice. Svi anotirani geni po podrazumevanoj postavci imaju prefiks „Fungi" u nazivu.

Naziv/ID gena		**Dužina (bp)**
CeNA1	Fungi_00002820	8962
CeNA1	Fungi_00002821	468
CeNA1	Fungi_00002822	1926
CeNA1	Fungi_00002824	1390
CeNA1	Fungi_00002825	468
CeNA1	Fungi_00002826	1516
CeNA1	Fungi_00002827	1398
CeNA1	Fungi_00002828	3572
CeNA1	Fungi_00002829	1619
CeNA1	Fungi_00002830	1584
CeNA1	Fungi_00002833	3227

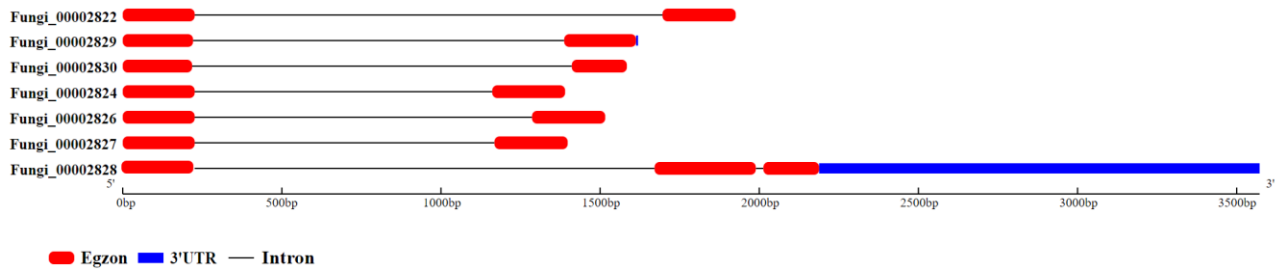
Poređenjem nukleotidnih sekvenci utvrđeno je da geni Fungi_00002828, Fungi_00002830, Fungi_00002829, Fungi_00002822, Fungi_00002824, Fungi_00002826 i Fungi_00002827 dele visok stepen homologije, 71,07% ili viši (**Slika 58.**). Najveća sličnost u nukleotidnim sekvencama primećena je između Fungi_000024 i Fungi_00002827, sa 99,49% međusobne sličnosti. S druge strane, sekvence Fungi_00002820, Fungi_00002833, Fungi_00002825 i Fungi_00002821 pokazuju manje od 50% sličnosti sa ostalim genskim kandidatima. Vrednosti se kreću od 47,87% za Fungi_00002820 i Fungi_00002833 do 15,38% između Fungi_00002827 i Fungi_00002825. Unutar ove grupe, najkraće sekvence Fungi_00002821 i Fungi_00002825 dele sličnost od 98,72% (**Slika 58.**).



Slika 58. Matrica sa prikazanim procentima sličnosti među genskim sekvencama *CeNA1* nađenih u genomu *C. erythraea*. Poravnavanje nukleotidnih sekvenci urađeno je korišćenjem *UniProt Align* alata.

Softverom *GSDS* su određene moguće koordinate egzona, introna, 3´UTR regiona i predviđene su egzon-intron strukture gena (**Slika 59.**, **Tabela 31.**). S obzirom na to da genske sekvence Fungi_00002820, Fungi_00002833, Fungi_00002825 i Fungi_00002821 nisu imale kompletne *ORF*-ove za njih nije bila moguća predikcija genske strukture. Većina *CeNA1* gena sa kompletnim *ORF*-ovima ima dva egzona koji su razdvojeni jednim intronom, osim najduže sekvence Fungi_00002828 koja sadrži tri egzona i dva introna (**Slika 59.**, **Tabela 31.**). Pozicije i dužine prvog egzona se uglavnom poklapaju kod svih homologa, dok pozicije drugog egzona variraju. Dužina prvog intona se kreće od 934 bp (Fungi_00002824) do 1469 bp (Fungi_00002822), a Fungi_00002828 ima dodatno jako kratki intron od 23 bp, za kojim sledi

3´UTR region dužine 1445 bp. Kod Fungi_00002829 postoji kratak 3´UTR region od samo pet nukleotida (**Slika 59.**, **Tabela 31.**).

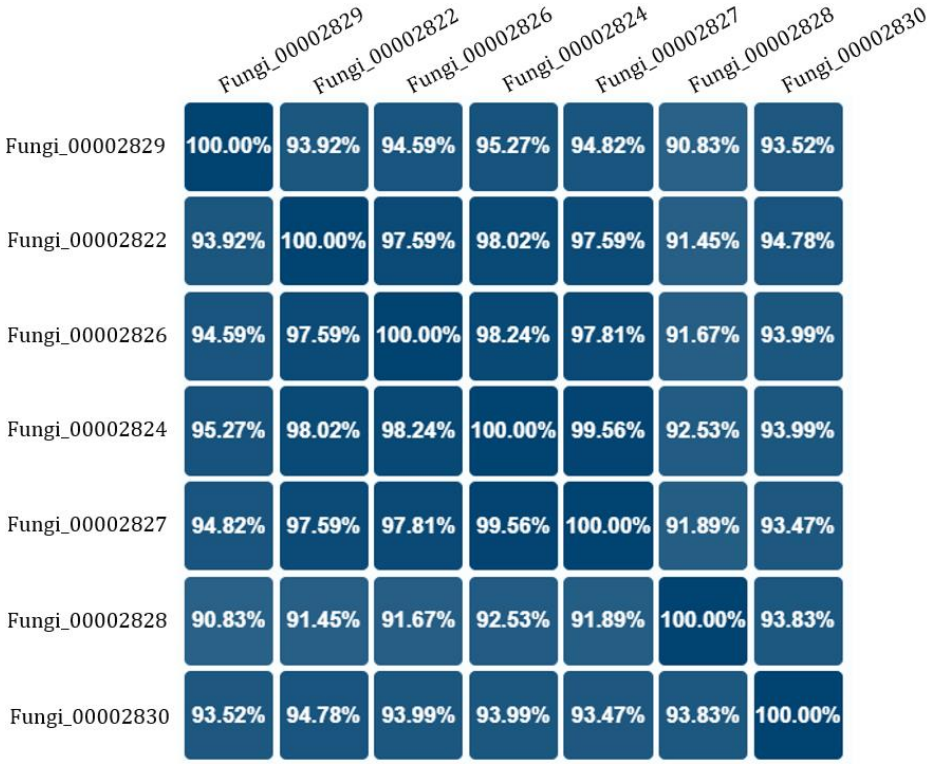


Slika 59. Moguće egzon-intron strukture homologa *CeNA1*. Crveni pravougaonici predstavljaju egzone, crne linije su introni, a tamno plavi pravougaonici predstavljaju 3´UTR regione. Predikcija je urađena pomoću softvera *GSDS*.

Tabela 31. Koordinate egzona, intona i 3'UTR regiona *CeNA1* homologa. Koordinate su određene pomoću *GSDS* softvera. Egz. - egzon; Int. - intron.

Naziv/ID gena		**Koordinate (bp)**					
		Egz. 1	**Int. 1**	**Egz. 2**	**Int. 2**	**Egz. 3**	**3' UTR**
CeNA1	Fungi_00002822	1 - 226	227 -1696	1697 -1926	/	/	/
CeNA1	Fungi_00002824	1 - 226	227 -1161	1162 -1390	/	/	/
CeNA1	Fungi_00002826	1 -226	227 -1286	1287 -1516	/	/	/
CeNA1	Fungi_00002827	1 -226	227 -1168	1169 -1398	/	/	/
CeNA1	Fungi_00002828	1 -226	227 -1671	1672 -1989	1990 - 2013	2014 - 2188	2189 -3572
CeNA1	Fungi_00002829	1 -221	222 -1387	1388 -1613	/	/	1614 - 1619
CeNA1	Fungi_00002830	1 -218	219 -1411	1412 -1584	/	/	/

Analizom kodirajućih sekvenci sedam gena *CeNA1*, utvrđeno je da su transkripti međusobno vrlo slični, sa preko 90% sličnosti u sekvencama (**Slika 60.**). Među njima su najsličniji transkripti Fungi_00002827 i Fungi_00002824, sa 99,56% identične sekvence.



Slika 60. Procenti sličnosti između sedam transkripata *CeNA1* gena. Poređenje sekvenci je urađeno pomoću alata *UniProt*.

U genomu su dodatno proverene funkcionalne anotacije za prediktovane *CeNA1* gene (**Tabela 32.**). Softver za anotaciju *MAKER-P* generiše kvalitativni parametar u vidu *AED* broja (engl. „*Annotation Edit Distance*“) za svaki gen (Campbell i sar. 2014). *AED* je opšti indikator koliko je anotacija gena podržana spoljnim dokazima (kao što su *UniProt* proteinske sekvence i transkripti) i izračunava se za svaki gen. Vrednosti AED se kreću od 0 do 1, pri čemu manji broj ukazuje na veću pouzdanost anotacije. Anotacije za genske homologe ne samo da nisu ujednačene već ne ukazuju na sličnost u sekvenci ni sa jednom biljnom vrstom. Umesto toga, većina identifikovanih anotacija potiče od organizama kao što su gljive (*Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*), ljudi (*Homo sapiens*), pacovi (*Rattus norvegicus*) i virusi (*Simian foamy virus type 1*) (**Tabela 32.**). Navedene anotacije za *CeNA1* gene nisu pouzdane i uključuju termine kao što su mitohondrijalna intermedijarna peptidaza OCT1 (engl. „*Organic Cation Transporter 1*“) iz *Debaryomyces hansenii,* proteini slični transmembranskom proteinu 209 iz *Rattus norvegicus,* te protein sličan trihohijalinu 1 kod čoveka (engl. „*Trichohyalin-like protein 1*“, TCHHL1). Najveća *AED* vrednost, a time i najmanja pouzdanost anotacije, je pronađena za sličnost sa virusnim Gag poliproteinom (**Tabela 32.**).

Tabela 32. Funkcionalna anotacija *CeNA1* gena na osnovu mapiranja TR23240|c0_g1_i1 transkripta na genom kičice.

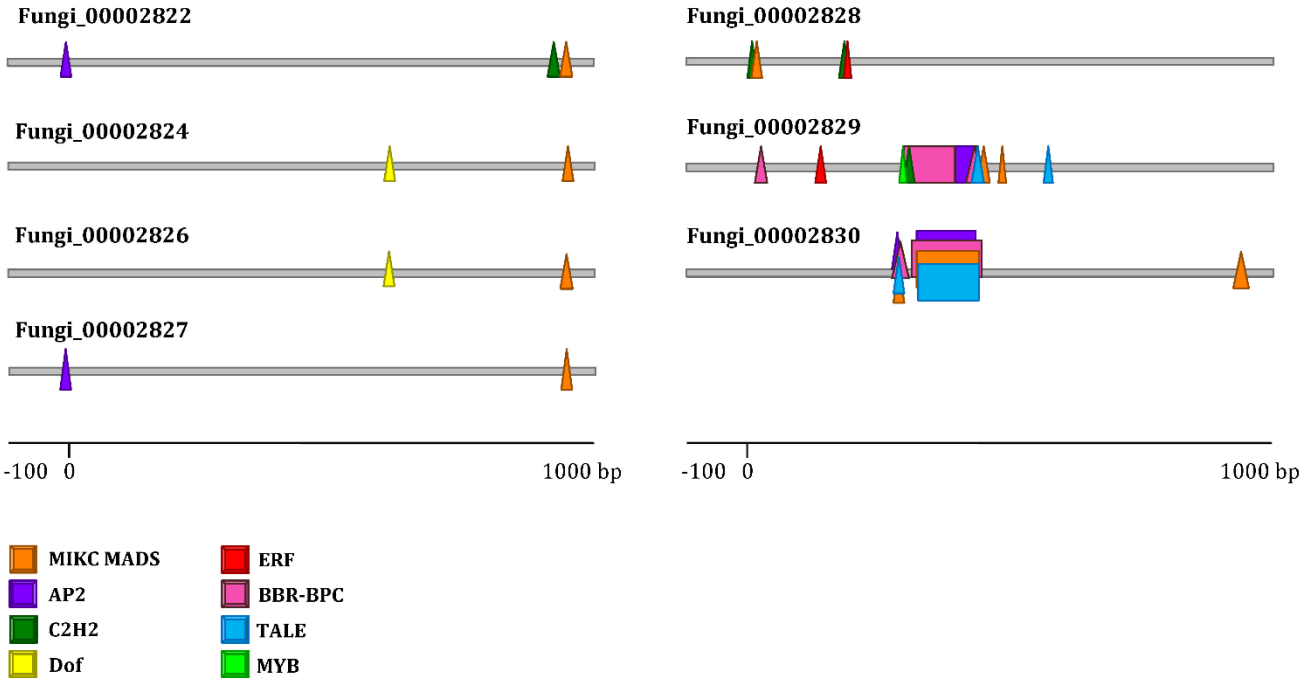
Naziv/ID proteina		**Anotacija proteina**	**Organizam**	***AED***
CeNA1	Fungi_00002822	Similar to ADR1 Regulatory protein ADR1	*Saccharomyces cerevisiae*	0,00
CeNA1	Fungi_00002824	Similar to transmembrane protein 209	*Rattus norvegicus*	0,00
CeNA1	Fungi_00002826	Similar to transmembrane protein 209	*Rattus norvegicus*	0,00
CeNA1	Fungi_00002827	Similar to TCHHL1 Trichohyalin-like protein 1	*Homo sapiens*	0,00
CeNA1	Fungi_00002828	Similar to Gag polyprotein	*Simian foamy virus type 1*	0,32
CeNA1	Fungi_00002829	Similar to OCT1 Mitochondrial intermediate peptidase	*Debaryomyces hansenii*	0,00
CeNA1	Fungi_00002830	Similar to OCT1 Mitochondrial intermediate peptidase	*Debaryomyces hansenii*	0,03

4.8.2. Analiza promotora *CeNA1* gena

Promotorski regioni sedam *CeNA1* gena analizirani su pomoću softvera *PlantRegMap*, pri čemu je analiza obuhvatila regione od 100 nukleotida nizvodno do 1000 nukleotida uzvodno od početka transkripcije. *In silico* predikcijom je ustanovljeno da se za promotore *CeNA1* gena mogu vezati TF iz osam familija: BBR-BPC, ERF, MYB, C2H2, AP2, MIKC MADS i TALE (**Tabela 33.**, **Slika 61.**). Iako ukupan broj familija TF nije veliki, broj vezivnih mesta varira među promotorima različitih homologa. Posebno se ističu promotori Fungi_00002829 i Fungi_00002830, koji imaju veći broj mesta za vezivanje TF u odnosu na ostale homologe. Za promotor Fungi_00002829 se mogu vezati TF iz sedam familija (sve osim Dof), pri čemu najviše vezivnih mesta, 21, postoji za familiju TF BBR-BPC (**Tabela 33**.). Posebno je zanimljiv kratki promotorski region ~ 300 do 450 bp uzvodno od početka transkripcije za koji se vezuju TF iz šest familija: BBR-BPC, ERF, MYB, C2H2, AP2, MIKC MADS, TALE (**Slika 61.**). Za promotor Fungi_00002830 se mogu vezati TF iz BBR-BPC, AP2, MIKC MADS i TALE familija, pri čemu postoji veći broj vezivnih mesta za sve navedene familije. Najviše mesta, čak 113, postoji za familiju BBR-BPC (**Tabela 33.**). U ovom promotoru je najinteresantniji region ~ 280 - 450 bp uzvodno od početka transkripcije u kome postoji veliki broj vezivnih mesta za BBR-BPC, AP2, MIKC MADS i TALE (**Slika 61.**). TF iz familije Dof imaju imaju identične obrasce vezivanja za promotore Fungi_00002824 i Fungi_00002826, dok se region za vezivanje MIKC MADS razlikuje samo u nekoliko nukleotida (**Slika 61.**). Za promotor Fungi_00002827 vezuju se dve familije TF (AP2 i MIKC MADS), pri čemu je najveći broj vezivnih mesta prisutan za familiju MIKC MADS. AP2 i MIKC MADS slične obrasce vezivanja za promotore Fungi_00002822 i Fungi_00002827, dok se u promotoru Fungi_00002822 takođe nalazi i jedno vezivno mesto za C2H2 (**Tabela 33.**, **Slika 61.**).

Tabela 33. *In silico* predikcija familija TF-a i broja specifičnih motiva za vezivanje TF u promotorima *CeNA1* gena.

Naziv/ID gena		Familija TF	Broj motiva za vezivanje TF
CeNA1	Fungi_00002822	AP2	1
		C2H2	1
		MIKC MADS	6
CeNA1	Fungi_00002824	Dof	1
		MIKC MADS	6
CeNA1	Fungi_00002826	Dof	1
		MIKC MADS	6
CeNA1	Fungi_00002827	AP2	2
		MIKC MADS	6
CeNA1	Fungi_00002828	MIKC MADS	1
		C2H2	4
		ERF	1
CeNA1	Fungi_00002829	BBR-BPC	21
		ERF	1
		MYB	1
		C2H2	2
		AP2	3
		MIKC MADS	5
		TALE	3
CeNA1	Fungi_00002830	BBR-BPC	113
		AP2	49
		MIKC MADS	59
		TALE	49



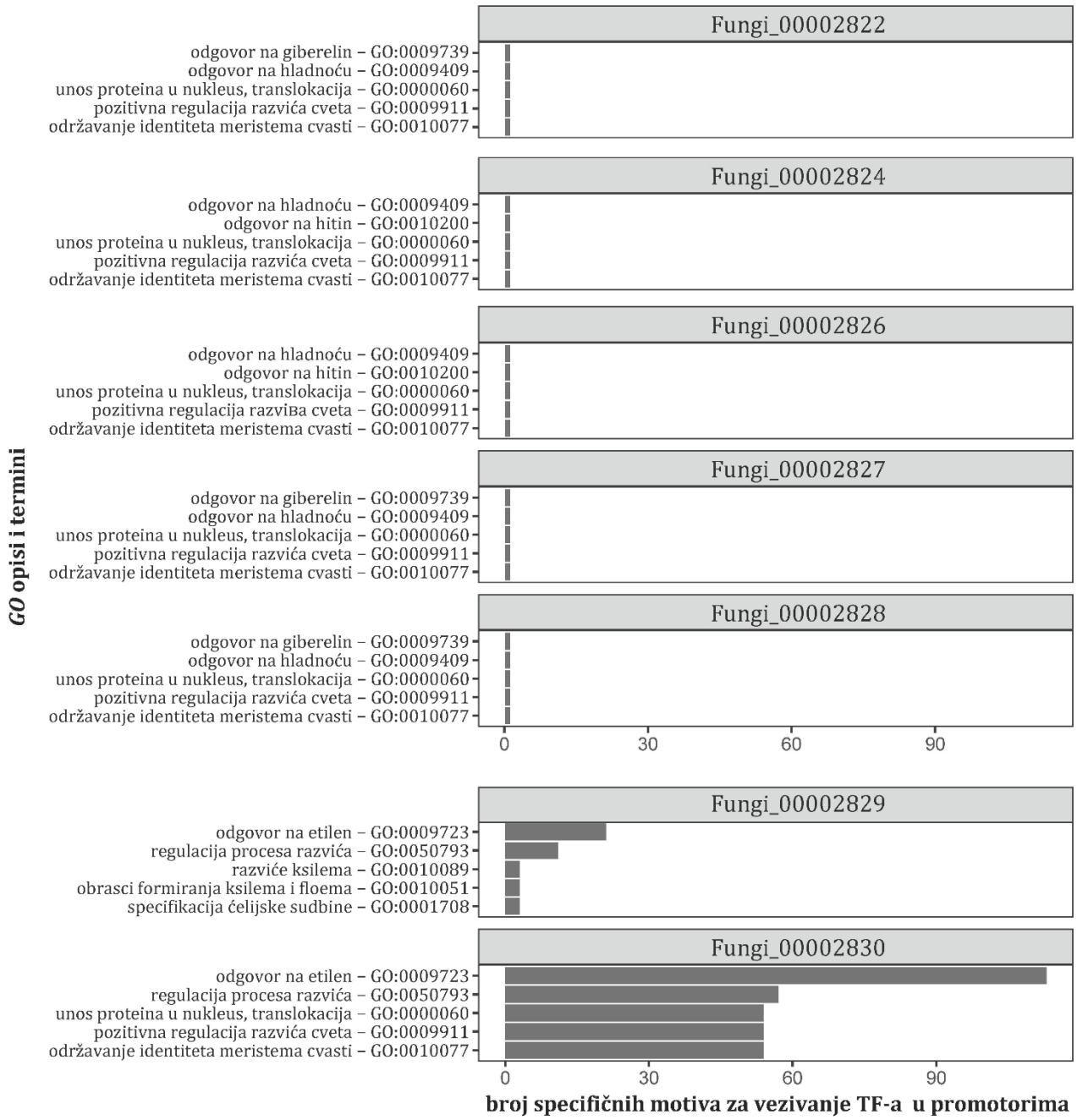
Slika 61. Moguća vezivna mesta TF za promotore sedam *CeNA1* gena. *In silico* pristup je obuhvatio region od 100 nt nizvodno i 1000 nt uzvodno od početka transkripcije.

Radi dalje karakterizacije promotora *CeNA1* gena, svim TF su dodeljeni *GO* termini pomoću *PlantRegMap* softvera na osnovu kojih se mogu pretpostaviti biološki procesi u kojima učestvuju. Na **Slici 62.** je za svaki promotor prikazano prvih pet najzastupljenijih *GO* termina TF zajedno sa brojem specifičnih motiva za koje se vezuju. Uobičajeni termini za TF, kao što su „pozitivna regulacija transkripcije" su izbačeni iz analize zbog nedovoljne informativnosti. Već je opisano da se u promotorima gena Fungi_00002822, Fungi_00002824, Fungi_00002826, Fungi_00002827 i Fungi_00002828 nalazi sličan broj motiva za vezivanje TF (šest do osam, **Tabela 33.**), a sudeći po *GO* terminima za ove TF, oni pretpostavljeno učestvuju u odgovoru na RRB (poput giberelina ili etilena), stres (hladnoća, prisustvo hitina zglavkara) i u unosu proteina iz citoplazme u nukleus. Dodatno, ovi TF pretpostavljeno učestvuju u regulaciji razvića cveta i održavanja identiteta meristema cvasti (**Slika 62.**). Transkripcioni faktori koji se vezuju za promotor Fungi_00002829 pretpostavljeno su povezani sa procesima razvića i diferencijacijom, formiranjem ksilema i floema, kao i sa odgovorom na etilen (**Slika 62.**). U promotoru Fungi_00002830 nalazi se najveći broj specifičnih motiva za vezivanje TF (ukupno 270, **Tabela 33**.), pri čemu je najveći broj regulisan etilenom (**Slika 62.**). Osim toga, TF koji se vezuju za promotor Fungi_00002830 pretpostavljeno učestvuju u unosu proteina u nukleus i procesu razvića, posebno cveta i održavanju identiteta meristema cvasti (**Slika 62.**).

Iako nisu među najzastupljenijim *GO* terminima, treba napomenuti da se među *GO* terminima MIKC MADS familije u promotorima Fungi_00002822, Fungi_00002826 i Fungi_00002830 našao *GO*:0010262 koji označava SE, odnosno indukciju nastanka somatskih embriona (**Tabela 34.**).

Tabela 34. Izdvojeni *GO* termini za TF iz familije MIKC MADS u promotorima Fungi_00002822, Fungi_00002826 i Fungi_00002830, koji označavaju proces SE.

Naziv/pristupni broj gena		**Familija TF**	***GO* termin**	**Opis *GO* termina**
CeNA1	Fungi_00002822	MIKC MADS	0010262	Indukcija SE
CeNA1	Fungi_00002826	MIKC MADS	0010262	Indukcija SE
CeNA1	Fungi_00002830	MIKC MADS	0010262	Indukcija SE



Slika 62. *GO* termini za najzastupljenije familije TF u genskim homolozima *CeNA1*. Za svaki gen je prikazano pet najzastupljenijih *GO* termina.

4.8.3. Karakteristike proteina CeNA1

Proteinske sekvence gena i transkripta *CeNA1* su izvučene iz transkriptoma i genoma *C. erythraea*. U **Tabeli 35.** su date dužine aminokiselinskih sekvenci koje imaju intaktne ORF-ove. Svi *CeNA1* geni kodiraju za proteine sa relativno kratkim lancem, dužine oko 100 ak, sa nešto većom dužinom od 194 ak kod Fungi_00002828.

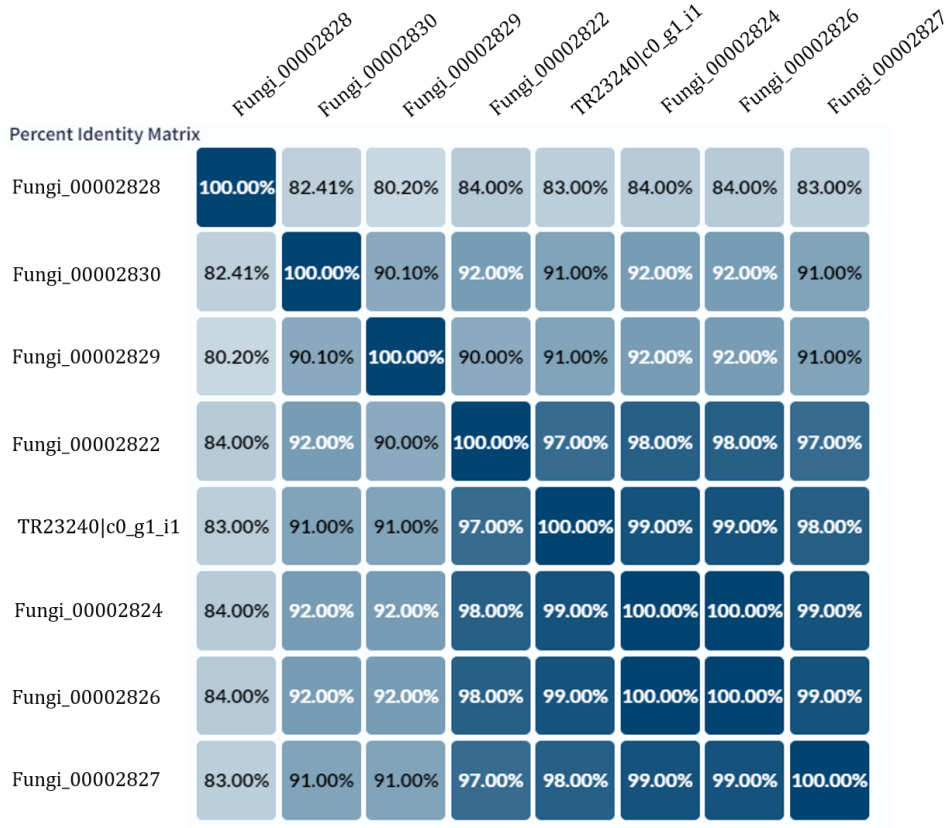
Tabela 35. Dužine *in silico* transliranih proteina CeNA1.

Naziv/ID proteina		Dužina (ak)
CeNA1	Fungi_00002822	100
CeNA1	Fungi_00002824	100
CeNA1	Fungi_00002826	100
CeNA1	Fungi_00002827	100
CeNA1	Fungi_00002828	194
CeNA1	Fungi_00002829	101
CeNA1	Fungi_00002830	108
CeNA1	TR23240|c0_g1_i1	100

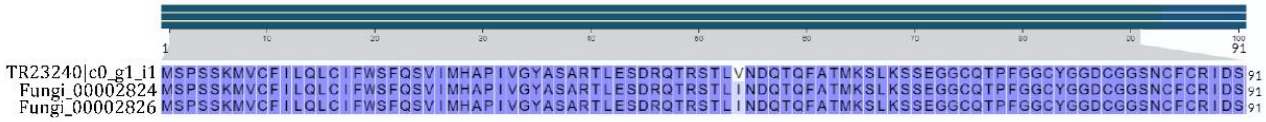
Aminokiselinska sekvenca transkripta TR23240|c0_g1_i1 (725 bp) je upoređena sa aminokiselinskim sekvencama sedam homologa CeNA1 iz genoma kako bi se utvrdio procenat sličnosti među njima. Filogenetsko stablo dobijeno poravnjavanjem ak sekvenci ukazuje da je TR23240|c0_g1_i1 najsličniji Fungi_00002824, Fungi_00002826 i Fungi_00002827 (**Slika 63.**). Na **Slici 64.** je prikazana matrica sa procentima koji ukazuju na međusobnu sličnost među ispitivanim kandidatima. Uočeno je da svi proteini dele visok stepen sličnosti, sa vrednostima ≥ 80,2 %. Dodatno, TR23240|c0_g1_i1 je najsličniji Fungi_00002824 i Fungi_00002826, sa 99% sličnosti.

Slika 63. Filogenetsko stablo sa aminokiselinskim sekvencama CeNA1. Dužina grana je proporcionalna izračunatim rastojanjima. Grana prikazana crvenom bojom predstavlja negativne vrednosti udaljenosti izmerene algoritmom i ne treba se tumačiti u biološkom kontekstu.

Upoređivanjem aminokiselinske sekvence TR23240|c0_g1_i1 sa najsličnijim sekvencama Fungi_00002824 i Fungi_00002826, uočeno je da se TR23240|c0_g1_i1 razlikuje od Fungi_00002824 i Fungi_00002826 u samo jednoj aminokiselini (**Slika 65.**). Naime, umesto valina koji se nalazi u TR23240|c0_g1_i1, u Fungi_00002824 i Fungi_00002826 se nalazi izoleucin. Osim toga, primećeno je da geni Fungi_00002824 i Fungi_00002826 kodiraju identične proteinske sekvence (**Slika 65.**).



Slika 64. Procenat identičnosti aminokiselinskih sekvenci homologa CeNA1. Poravnavanje sekvenci urađeno je pomoću *UniProt Align* alata.



Slika 65. Poravnanje aminokiselinskih sekvenci TR23240|c0_g1_i1, Fungi_00002824 i Fungi_00002826. Tamno ljubičastom bojom su osenčene identične ak u tri sekvence, dok su svetlo ljubičasto označene različite ak u odnosu na TR23240|c0_g1_i1.

4.8.4. Predikcija N-terminalnog peptida i unutarćelijske lokalizacije proteinskih homologa CeNA1

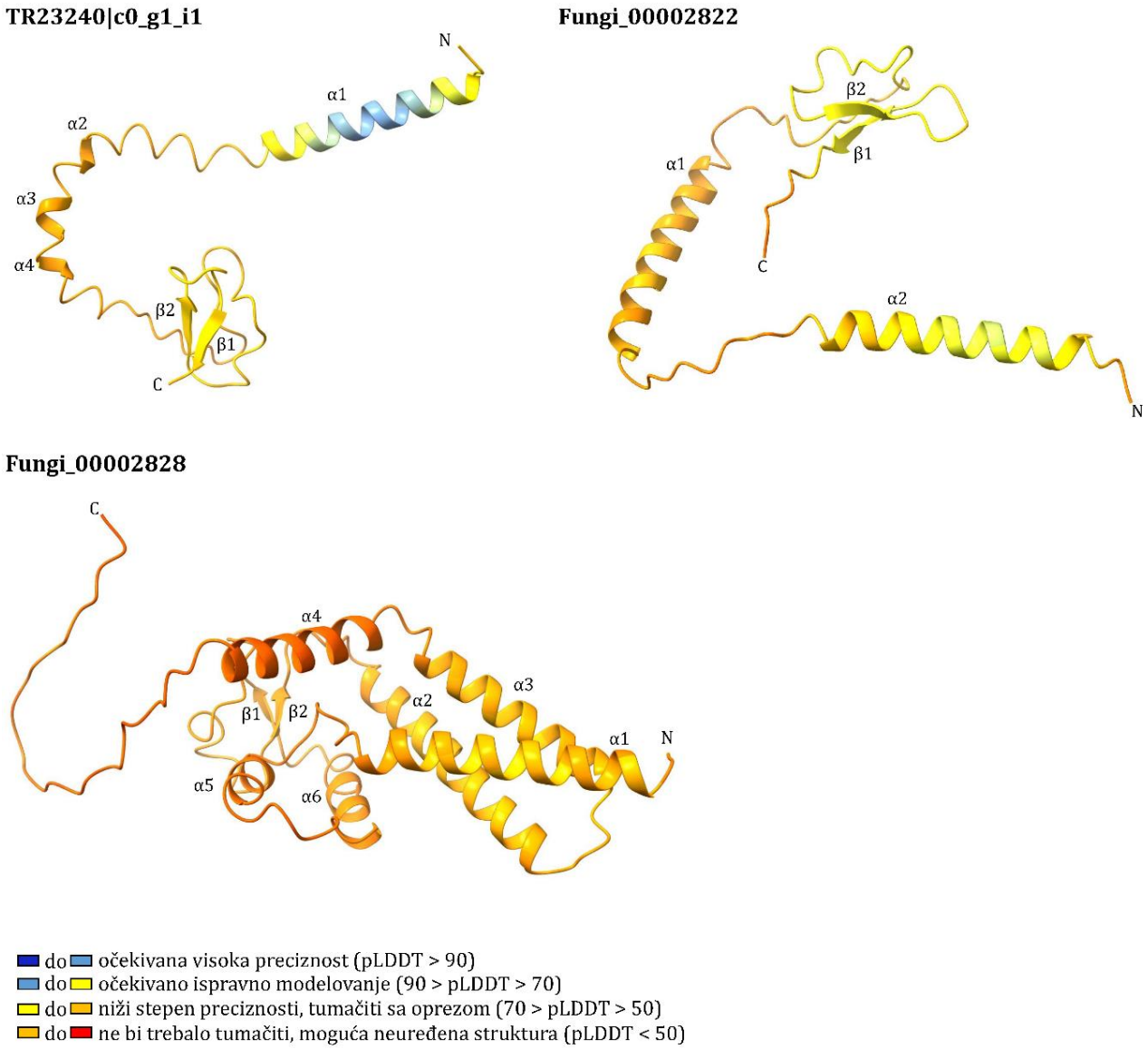
Korišćenjem softvera *Target P2*, *Cello*, *DeepLoc* i *LA* prediktovano je prisustvo tranzitnog peptida na N-terminusu, unutraćelijska lokalizacija i vezanost za ćelijsku membranu u proteinima CeNA1 (**Tabela 36.**). Svi korišćeni softveri predviđaju da CeNA1 sadrže signalni peptid (SP) na N-terminusu i da pripadaju ekstracelularnim proteinima. Dodatno, softver *LA* predviđa i vezanost za membranu i po njemu su svi CeNA1 proteini solubilni (**Tabela 36.**).

Tabela 36. Predikcija N-terminalnog peptida i unutarćelijske lokalizacije za osam proteinskih CeNA1 homologa. Korišćeni su softveri *Target P2*, *Cello*, *DeepLoc* i *LA*. SP – signalni peptid; Ekstracel. – ekstracelularni; Sol. – solubilni.

ID proteina	*Target P2*	*Cello*	*DeepLoc*		*LA*	
	N-peptid	**Lokalizacija**	**Lokalizacija**	**N-peptid**	**Lokalizacija**	**Vezanost za memb.**
TR23240|c0_g1_i1	SP	Ekstracel.	Ekstracel.	SP	Ekstracel.	Sol.
Fungi_00002822	SP	Ekstracel.	Ekstracel.	SP	Ekstracel.	Sol.
Fungi_00002824	SP	Ekstracel.	Ekstracel.	SP	Ekstracel.	Sol.
Fungi_00002826	SP	Ekstracel.	Ekstracel.	SP	Ekstracel.	Sol.
Fungi_00002827	SP	Ekstracel.	Ekstracel.	SP	Ekstracel.	Sol.
Fungi_00002828	SP	Ekstracel.	Ekstracel.	SP	Ekstracel.	Sol.
Fungi_00002829	SP	Ekstracel.	Ekstracel.	SP	Ekstracel.	Sol.
Fungi_00002830	SP	Ekstracel.	Ekstracel.	SP	Ekstracel.	Sol.

4.8.5. Tercijarna struktura proteina CeNA1

Na **Slici 66.** su prikazane pretpostavljene trodimenzionalne strukture za tri najrazličitija predstavnika grupe CeNA1 proteina - TR23240|c0_g1_i1, Fungi_00002822 i Fungi_00002828. Modeli su prediktovani pomoću programa *AlphaFold* i vizuelizovani pomoću *UCSF ChimeraX* softvera (Jumper i sar. 2021). Na osnovu intervala pouzdanosti struktura (*Predicted Local Distance Difference Test*, pLDDT), modeli su obojeni u nijansama od tamno plave (visoka pouzdanost predikcije) do crvene (moguća neuređena struktura) (Jumper i sar. 2021). U pretpostavljenom modelu proteina TR23240|c0_g1_i1 zapažaju se strukture jednog dužeg α-heliksa, tri jako kratka α-heliksa i β-ploče sa dva lanca (**Slika 66.**). TR23240|c0_g1_i1 pokazuje najuređeniju strukturu u centru α-heliksa blizu N-terminusa. Prediktovane strukture su odvojene nestrukturisanim delovima proteina koji imaju izgled trake. Pretpostavljena 3D struktura TR23240|c0_g1_i1 je vrlo slična strukturama Fungi_00002824 i Fungi_00002826 (rezultati nisu prikazani). Druga moguća tercijarna struktura proteina prikazana je na modelu Fungi_00002822 (**Slika 66.**), a zapaža se još u peptidima Fungi_00002827, Fungi_00002829 i Fungi_00002830 (rezultati nisu prikazani). Ovi proteini se sastoje iz dva α-heliksa i dvolančane β-ploče i pokazuju niži stepen preciznosti predikcije u odnosu na TR23240|c0_g1_i1 i nestrukturisane delove. Model 3D strukture Fungi_00002828 je jedinstven u CeNA1 proteinskoj familiji i odlikuje ga šest α-heliksa i β-ploča sa dva lanca (**Slika 66.**). Međutim, u modelu je izražen najniži stepen pouzdanosti koji bi trebalo tumačiti sa oprezom, odnosno verovatno je u pitanju neuređena struktura proteina.



Slika 66. *In silico* predikcija moguće 3D tercijarne strukture proteina TR23240|c0_g1_i1, Fungi_00002822 i Fungi_00002828. Model je napravljen pomoću alata *AlphaFold* i vizuelizovan preko *UCSF ChimeraX* softvera. Prikazani su rezultati za tri tipične strukture u okviru familije. Nijanse boja modela se kreću od plave ka crvenoj i označavaju veću, odnosno manju pouzdanost predikcije, redom.

5. Diskusija

5.1. Opšte karakteristike transkriptoma *C. erythraea* Rafn.

RNA-seq pristup zasnovan na *NGS*-u se poslednjih godina u velikoj meri koristi u projektima *de novo* sekvenciranja i sastavljanja transkriptoma mnogih biljnih vrsta (Yan i sar. 2015, Li i sar. 2016, Zhou i sar. 2016). Analizom različitih ekspresionih profila i detekcijom transkripata u različitim tkivima, može se steći uvid u gene i biološke procese koji su usko povezani sa specifičnim tkivima (Kamphuis i sar. 2015). Kako bi se omogućio sveobuhvatan pregled transkriptoma *C. erythraea*, koji će služiti kao polazna tačka za identifikaciju gena uključenih u morfogenezu *in vitro,* sintetisano je i sekvencirano šest cDNK biblioteka poreklom od **rl**, **rk**, **ek**, **kse**, **gse** i **aplh** (**Slika 22.**, **Slika 23.**, **Tabela 1.**). Uzorci su sekvencirani na *Illumina* platformi u kojoj je implementirana *Trinity* tehnologija koja konstruiše i analizira setove de Bruijnovih grafova na osnovu kojih u potpunosti rekonstruiše veliku količinu transkripata, uključujući i alternativno splajsovane izoforme i transkripte dupliranih gena (Haas i sar. 2013). Ovakav pristup je naročito pogodan za rekonstrukciju transkriptoma u odsustvu referentnog transkriptoma ili genoma, a jednako je zastupljen i u istraživanju vrsta koje nisu model organizmi (Grabherr i sar. 2011). Sve što je pre sekvenciranja bilo poznato je da je *C. erythraea* tetraploid (2n = 4k = 40) (Mansion i sar. 2005) sa procenjenom veličinom genoma između 1,03 (Bou Dagher-Kharrat i sar. 2013) i 1,2 pg/1C (Bennett i Smith 1991), što odgovara 1007–1174 Mbp (s obzirom da je 1 pg DNK jednak 978 Mpb, Dolezel (2003)). *Trinity* grupiše zajedno sekvence koje verovatno potiču od alternativno splajsovanih transkripata ili blisko srodnih porodica gena (Haas i sar. 2013), ali ne može utvrditi biološko poreklo varijabilnosti među sličnim sekvencama. U ovom kontekstu treba napomenuti da je *C. erythraea* veoma polimorfna vrsta (Ubsdell 1976, Mansion i sar. 2005), pa iako uzorci sekvenciranja potiču od istog *in vitro* propagiranog klona, mnoge „izoforme“ mogu predstavljati različite alele. Nije poznato kako su nastali tetraploidi *C. erythraea* Rafn. (Ubsdell 1976), ali nedavna istraživanja sugerišu da je alopoliploidija glavni evolutivni trend u rodu *Centaurium*, u okviru kojeg je česta interspecijska hibridizacija (Mansion i sar. 2005, Banjanac i sar. 2014). Ako je *C. erythraea* Rafn. alotetraploid, onda sadrži homologe gene kako su definisali Glover i sar. (2016). Konačno, duplirani kontizi različite dužine, splajsovane izoforme i funkcionalne izoforme takođe treba da budu prisutne, kao u bilo kom transkriptomu.

Putem *de novo* sastavljanja transkriptoma generisano je 142 Mbp podataka sa blizu 200 miliona „čistih“ očitavanja i ukupno 105726 identifikovanih „unigena“. Karakteristike transkripata kao što su prosečna i medijana dužine kontiga (**Tabela 21.**) uporedivi su sa podacima dobijenim u sličnim projektima, kao što su *de novo* sastavljeni transkriptomi orhideje *Phalaenopsis equestris* (Niu i sar. 2016), *Arceuthobium sichuanense* (Wang i sar. 2016) ili *Miscanthus lutarioriparius* (Hu i sar. 2017), ali nešto manje u odnosu na transkriptom *Prunus salicina* (Jo i sar. 2015).

Sekvenciranje transkriptoma iz više tkiva smatra se najkritičnijim aspektom pokrivenosti transkriptoma (Torrens-Spence i sar. 2016). Vrednost N50 sumira pokrivenost sklapanja transkriptoma u jedan broj i označava da je polovina transkriptoma sastavljena na kontizima dužine N50 ili dužim. Iako se računanje N50 vrednosti tradicionalno koristi za određivanje kvaliteta transkriptoma, takvi parametri ne procenjuju pokrivenost u smislu sadržaja gena, što je važno zapažanje koje utiče na interpretaciju podataka i pomaže u ostvarivanju boljih strategija sklapanja i anotacije (Simão i sar. 2015). *BUSCO* analiza se oslanja na evolutivno-informisana predviđanja genskog sadržaja putem skupa gotovo univerzalnih ortologa sa jednom kopijom (Waterhouse i sar. 2017). *BUSCO* je odličan alat za kvantifikaciju pokrivenosti transkriptoma jer se oslanja na bazu ortolognih gena, za koje su evolutivno

moguća očekivanja da će se naći u transkriptomu u samo jednoj kopiji (Simão i sar. 2015). Na taj način *BUSCO* omogućava biološku interpretaciju kvaliteta transkriptoma (Torrens-Spence i sar. 2016), sa sposobnošću identifikacije subsetova gena kao što su potpuni, duplirani, fragmentisani i nedostajući geni (Waterhouse i sar. 2017). Smatra se da je transkriptom visokog kvaliteta ako sadrži preko 80% *BUSCO* gena (Torrens-Spence i sar. 2016), pa se može zaključiti da je *C. erythraea* transkriptom veoma visokog kvaliteta sa rezultatom od 94,9% (**Tabela 22.**), bez obzira na N50 kontiguitet, koji je slabo korelisan sa *BUSCO* analizom pokrivenosti (Simão i sar. 2015). Vrednost N50 se može posmatrati kao srednja tačka distribucije dužine očitavanja, međutim, ona se treba tumačiti u kontekstu ukupnog broja očitavanja. Same vrednosti N50 mogu navoditi na pogrešne zaključke i prema tome nisu najpouzdanija mera za procenu kvaliteta sklapanja transkriptoma.

BUSCO su odabrani kao geni koji evoluiraju pod „kontrolom jedne kopije" (Waterhouse i sar. 2017), što znači da oni ne samo da su skoro univerzalno prisutni unutar svake evolucijske linije, već su prisutni kao ortolozi u jednoj kopiji. Relativno visok procenat dupliranih kompletnih *BUSCO* gena u transkriptomu kičice (53,7%, **Tabela 22.**) može biti posledica prisustva dupliranih kontiga različite dužine (definisanih kao izoforme) ili heterozigotnih alela koji nisu uspeli da se spoje tokom sklapanja, što može imati i biološki, a ne samo tehnički uzrok. Naime, veoma visok nivo duplikacija u *de novo* sklopljenim kontizima (82,95%) tokom poravnavanja sa *BUSCO* genima je primećen za visoko poliploidnu šećernu trsku (Hoang i sar. 2017), dok je tetraploidna borovnica *Vaccinium corymbosum* imala veći nivo duplikacija u poređenju sa diploidnom *V. arboreum* (Paya-Milans i sar. 2018). Drugim rečima, prisustvo homologa u tetraploidnoj vrsti kao što je *C. erythraea* verovatno doprinosi povećanju duplikacija *BUSCO* gena.

Transkripti kičice u vidu *FPKM* vrednosti su kvantifikovani pomoću *RSEM* alata koji procenjuje relativnu zastupljenost transkripata na osnovu broja *RNA-seq* fragmenata koji se poravnavaju sa svakim *Trinity* transkriptom (Li i sar. 2016). Uopšteno se smatra da se svaki uspešno sastavljeni transkript na osnovu *RNA-seq* analize eksprimira, pri čemu što je veća *FPKM* vrednost gena, to je veća pretpostavljena ekspresija tog gena. Relativna zastupljenost transkripata u vidu *FPKM* vrednosti procenjena je pomoću *RSEM* softvera, koji normalizuje faktore koji mogu uticati na kvantifikaciju transkripata, kao što su dubina sekvenciranja, dužina transkripata i varijabilnost između uzoraka. Glavna prednost *RSEM* softvera je što ne zahteva postojanje referentnog transkriptoma, što ga čini posebno korisnim za projekte *de novo* sastavljanja (Li i Dewey 2011). Transkripti u šest transkriptoma kičice imaju uporedivu raspodelu *FPKM* vrednosti (**Slika 24.**), sa najvećim brojem transkripata sa *FPKM* vrednostima u opsegu od 0,1–100 *FPKM*. Transkripti koji imaju *ORF* su pretpostavljeno ispravno sastavljeni i imaju veće *FPKM* vrednosti u poređenju sa transkriptima bez predvidjenog *ORF*-a iz istog transkriptoma. Transkripti sa niskim ili nultim *FPKM* vrednostima imaju upitan biološki značaj (Wells i sar. 2015).

5.2. Funkcionalna anotacija transkriptoma

Funkcionalna anotacija sekvenci je osnovni pristup za korišćenje funkcionalnih „omika" za analizu istraživanih vrsta. Transkripti kičice su anotirani mapiranjem prema nukleotidnim (*NCBI nt*) i proteinskim (*NCBI nr*, *KOG* i *PFAM30*) bazama podataka, pri čemu je od 160839 *Trinity* transkripata, 94701 (ili 58,8%) pronađeno u bar jednoj bazi (sa E-vrednošću od 10^{-5}), a 31409 (ili 19,5%) transkripata je pronađeno u svim bazama podataka (**Slika 25**.). Veliki procenat transkripata (66138 ili 41,1%) je ostao neidentifikovan, što je sasvim uobičajeno u projektima *de novo* sekvenciranja (Wang i sar. 2016, Cao i sar. 2017, Hu i sar. 2017). Na primer, u pustinjskom drvetu *Haloxylon ammodendron*, približno 62,48% „unigena" je ostalo neidentifikovano (Wang i sar. 2016). Moguće je da su mnoge od ovih sekvenci zapravo

netranslirani regioni (UTR) ili *ncRNA*. Pored toga, pošto je tačnost *BLAST* pretraga određena dužinom sekvenci upita, kratke sekvence se često ne poklapaju sa poznatim genima.

Distirbucija *PFAM* domena u *in silico* transliranom proteomu kičice (**Slika 26.**) ukazuje na najveću zastupljenost protein kinaznih domena, ali i proteina sa PPR i LRR motivima. Smatra se da proteini sa PPR motivima vezuju RNK i učestvuju u obradi RNK, editovanju i translaciji u mitohondrijama i hloroplastima (Lurin i sar. 2004). Proteini koji sadrže PPR motive, dugački 35 ak i organizovani kao tandemski ponovci, često se nalaze u biljkama i čine velike porodice gena. Veliki broj pretpostavljenih proteina kičice sa PPR domenima koji su neophodni za sintezu organela (Lurin i sar. 2004) je u skladu sa visokom proliferativnom aktivnošću tkiva gajenih u uslovima *in vitro*. Većina proteina sa LRR domenima je uključena u protein-ligand ili protein-protein interakcije, pri čemu je većina ponavljajućih jedinica dužine 20-30 ak (Matsushima i Miyashita 2012).

Poravnanje predviđenog proteoma kičice sa *KOG* bazom podataka omogućilo je identifikaciju ortolognih i paralognih proteina i njihovu klasifikaciju (**Slika 27.**). *KOG* anotacija ne samo da predviđa potencijalnu funkciju *in silico* prevedenog proteina, već pomaže i u proceni pouzdanosti sklapanja transkriptoma, anotacije i njegove pokrivenosti. Najveći broj transkripata spada u „Predviđanje opšte funkcije" (5898 transkripata ili 3,67 % svih transkripata), „Mehanizmi transdukcije signala" (5421 ili 3,37% transkripata) i „Posttranslaciona modifikacija, obnavljanje/zamena proteina, šaperoni" (4562 ili 2,84%), što je u skladu sa drugim projektima sekvenciranja biljnih transkriptoma (Wang i sar. 2016, Zhang i sar. 2016, Hu i sar. 2017). Najmanju kategoriju sa samo 22 transkripta čini „Pokretljivost ćelija", što je i očekivano za sesilne biljne organizme.

Jedan od najvažnijih preduslova za tumačenje podataka genomike ili transkriptomike kod organizama koji nisu model sistemi je dodeljivanje biološke funkcije pojedinačnim sekvencama. Jedan od precizno definisanih načina je dodeljivanje *GO* klasa transkriptima u odnosu na to koje atribute gena opisuju - biološki proces, molekularnu funkciju ili ćelijsku komponentu (Ashburner i sar. 2000). *GO* omogućava anotaciju homologih genskih i proteinskih sekvenci na fleksibilan i dinamičan način, koristeći zajednički vokabular koji omogućava pronalaženje gena i proteina na osnovu njihovih zajedničkih bioloških karakteristika (Ashburner i sar. 2000). U sekvenciranom transkriptomu kičice 75485 transkripata je *GO* anotirano, sa dodeljenom *GO* klasom za preko 60000 transkripata iz svakog od šest uzoraka (**Slika 25.**). Kada je reč o atributima kojima pripadaju *GO* klase, od ukupno 160839 transkripata i 23021 *GO* klasa, najveći broj pripada „biološkom procesu" (72179), „molekularnoj funkciji" (72597) i „ćelijskoj komponenti" (70795). Najzastupljenije *GO* klase opisuju procese „vezivanje za proteine", „membrana", „citoplazma" i „nukleus" sa (preko 30000 transkripata svaki, **Slika 28.**), što je slično projektima sekvenciranja transkriptoma povezanih sa SE u kamforovom drvetu (*Cinnamomum camphor*a L.) (Shi i sar. 2016) i planinskom pamuku (*G. hirsutum* L.) (Cheng i sar. 2016).

5.3. Procena stabilnosti ekspresije *housekeeping* gena u kolekciji tkiva i organa kičice

RNA-seq se prvenstveno primenjuje radi analize transkriptoma različitih vrsta. Međutim, iako je najčešći ishod pretraga podataka identifikacija DEG, *RNA-seq* podaci se takođe mogu koristiti pri izboru adekvatnih referentnih gena (Zhuang i sar. 2015). Međutim, izračunati nivoi ekspresije (*FPKM*) iz transkriptoma različitih uzoraka kičice (npr. **Slika 24**.) mogu pružiti samo široku i grubu selekciju gena, dok je za fino profilisanje ekspresije neophodna verifikacija metodom RT-qPCR. Iako RT-qPCR omogućava kvantifikaciju transkripata na precizan i reproducibilan način (Sa 2009), na preciznost metode snažno utiče stabilnost referentnih gena

koji se koriste za normalizaciju podataka. Izbor referentnih gena može varirati među različitim vrstama, sortama, eksperimentalnim uslovima i testiranim tkivima, i zato je pre ispitivanja ekspresije gena neophodno utvrditi optimalne referentne gene u željenim tkivima (Kanakachari i sar. 2016). Dobar referentni gen bi trebalo da ima što stabilniju ekspresiju (ili mali stepen varijabilnosti) u svim uzorcima, nezavisno od eksperimentalnih uslova ili vrste tkiva. Međutim, u najvećem broju slučajeva ne postoji univerzalni gen koji se stabilno eksprimira u svim testiranim uzorcima (Andersen i sar. 2004), a neke studije na tu temu čak navode da takav gen ne postoji (He i sar. 2016). Možda je tačno da univerzalno stabilan *housekeeping* gen ne postoji, ali u istraživanjima koja su ograničena na nekoliko tipova tkiva ili nekoliko različitih histoloških stadijuma istog tkiva (npr. normalno i tumorsko) takav gen nije ni neophodan (Andersen i sar. 2004). Međutim, kolekcija tkiva kičice je veoma raznovrsna i obuhvata 16 različitih tkiva i organa (**Slika 22.**, **Slika 23.**, **Tabela 1.**). Kada se uzorci u velikoj meri razlikuju, očekivano je da neki geni koji su stabilni u određenoj fazi više nisu stabilni u drugim fazama razvića (de Vega-Bartol i sar. 2013). U ovako velikim eksperimentalnim postavkama, varijacije u ekspresiji kontrolnih gena itekako mogu negativno uticati na interpretaciju dobijenih rezultata, te je poželjna kombinacija više referentnih gena.

Izbor gena kandidata je podrazumevao nekoliko često korišćenih *housekeeping* gena u literaturi, kao što su geni za α- i β-tubulin, 18S RNK, elongacioni faktor 2 i histon H3, koji učestvuju u bazičnim procesima u ćeliji, kao što su primarni metabolizam ili održavanje strukture ćelije (Lin i Lai 2010, Maroufi i sar. 2010, Schmidt i Delaney 2010, Migocka i Papierniak 2011, Xu i sar. 2011, Zhu i sar. 2012). Do danas je zabeleženo nekoliko istraživanja o odabiru odgovarajućih internih kontrola za SE kod biljaka kao što su lalino drvo (Li i sar. 2021), primorski bor (Gonçalves i sar. 2005), pamuk (Tu i sar. 2007), longan drvo (Lin i Lai 2010), narandža (Kou i sar. 2012) i neke vrste četinara (de Vega-Bartol i sar. 2013). Treba napomenuti da su se u nekima od njih proučavale golosemenice kod kojih proces SE nije sasvim isti kao kod skrivenosemenica (von Arnold i sar. 2002). Analizi identifikacije stabilno eksprimiranih gena u kičici su pridodati neki od ovih gena kao što je *AK* i već pomenuti geni za α- i β-tubulin, 18S RNK i histon H3 (Tu i sar. 2007, Lin i Lai 2010, de Vega-Bartol i sar. 2013, Li i sar. 2021). Većina gena je odabrano tako da budu funkcionalno raznovrsni kako bi se smanjila šansa njihove koregulacije (Vandesompele i sar. 2002); međutim, neki parovi gena jesu uključeni u iste procese (npr. ribozomske komponente *18S* rRNK i *RPL2*, α - i β -tubulin i dve *Fe-SOD* izoforme). Osim stabilne ekspresije među različitim tkivima ili tretmanima, dobar referentni gen bi trebalo da ispunjava nekoliko drugih kriterijuma: ne bi trebalo da se povezuje sa bilo kojim pseudogenima (da bi se izbegla amplifikacija genomske DNK); njegova amplifikacija bi trebalo da odražava varijacije u kvantitetu i kvalitetu RNK, kao i efikasnosti sinteze cDNK (Wan i sar. 2010). Pored toga, trebalo bi da ima srednji nivo ekspresije (Ct između 15 i 30, Wan i sar. 2010), i zaista, većina genskih kandidata kičice spada u taj opseg (**Slika 30.**). U odsustvu referentnog genoma u toku izvođenja eksperimenta, bilo je nemoguće tražiti pseudogene povezane sa odabranim genima. S obzirom na to da različiti pristupi vrednovanja stabilnosti ekspresije često daju različite rezultate, poređenje različitih algoritama postaje standardizovani pristup (Lin i Lai 2010, Schmidt i Delaney 2010, Xu i sar. 2011).

Stabilnost ekspresije 11 gena je procenjena pomoću dva najčešće korišćena algoritma za određivanje stabilnosti ekspresije - *geNorm* (Vandesompele i sar. 2002) i *NormFinder* (Andersen i sar. 2004). Metodom *GeNorm* se procenjuje stabilnost ekspresije gena pomoću M vrednosti, koje predstavljaju prosečnu varijaciju u ekspresiji tog gena u odnosu na ostale genske kandidate (Vandesompele i sar. 2002). Što je niža M vrednost, to je veća stabilnost ekspresije gena. Najmanje stabilan gen se eliminiše (onaj sa najvećom M vrednošću), a zatim se preračunavaju nove M vrednosti za preostale gene. Prosečna M vrednost za svih 11 gena bila je ispod 1,5 u svim skupovima uzoraka, osim u najrazličitijem skupu svih organa i stadijuma razvića, što ukazuje da su izabrani kandidati relativno stabilno eksprimirani (Vandesompele i

sar. 2002). Stabilnost genske ekspresije jedanaest kandidata je dalje izračunata pomoću *NormFinder*-a, koji poredi varijacije između i unutar skupova uzoraka i kombinacijom oba rezultata računa vrednost stabilnosti za svaki gen (Andersen i sar. 2004). Referentni geni sa nižim vrednostima stabilnosti ekspresije se stabilnije eksprimiraju, jer manje variraju između i unutar grupa. Oba algoritamska pristupa svrstavaju *RPL2* u dva najstabilnije eksprimirana gena u svim grupama uzoraka (**Slika 31**, **Tabela 23.**). Prema *NormFinder*-u, za njim sledi *TBP1,* a prema *geNorm*-u drugo mesto zauzima *RAN.* Međutim, prema *NormFinder*-u*, RAN* je u prva 3 najstabilnije eksprimirana gena jedino u grupi uzoraka iz prirode (**Tabela 23.**). Još jedan gen se istakao po stabilnosti - *AK* je u prva 3 najbolja rezultata u tri od četiri grupe uzoraka po *NormFinder*-u, dok je prema *geNorm*-u on u najbolja 3 u dve grupe uzoraka (**Tabela 23.**). Ove razlike su između predikcija su očekivane jer se programi oslanjaju na različite statističke algoritme. Dok *geNorm* pokazuje osetljivost prema izboru gena eksprimiranih na isti način, rezultati koje obezbeđuje *NormFinder* nisu značajno pod uticajem korelisane ekspresije između gena kandidata.

Geni za ribozomalne proteine se ne koriste često kao referentni geni. Međutim, prema *geNorm* proceni, ribozomalni protein L2 (*RPL2*) se pokazao kao prilično stabilan tokom tretmana abiotičkog i biotičkog stresa u krompiru (Nicot i sar. 2005). Ribozomalni protein L25, je takođe bio jedan od najstabilnijih gena tokom razvića i stresa u uzorcima *Nicotiana* prema *geNorm*-u ali ne i *NormFinder* ili *CV* (koeficijenti varijanse) analizama (Schmidt i Delaney 2010). Još jedan ribozomalni protein, L4, je prema *geNorm*-u visoko rangiran u različitim tkivima tokom razvića banane (Chen i sar. 2011). Pošto je ovaj gen svrstan među 2 najstabilnija gena u skoro svim uzorcima kičice pomoću oba algoritma, trebalo bi da bude prvi izbor u daljim istraživanjima, u kombinaciji sa *TBP1*, *RAN* i/ili *AK* (**Slika 31**, **Tabela 23.**). Pokazano je da su TATA-vezujući proteini 1 i 2 (*TBP1* i *TBP2*) stabilno eksprimirani u različitim eksperimentalnim uslovima u papaji (Zhu i sar. 2012), dok je *TBP1* takođe bio među najstabilnijim genima pod abiotičkim stresom kod *Brassica oleracea* (Brulle i sar. 2014). Nukleusni protein povezan sa *RAS*-om (*RAN*, takođe poznat kao GTP-vezujući nukleusni protein) dobro se pokazao u grupi uzoraka različitih faza razvića u papaji (Zhu i sar. 2012) i u različitim uzorcima tkiva banana (Chen i sar. 2011). Konačno, adenozin kinaza (*AK*) se retko koristi kao referentni gen, ali u proučavanju SE četinara je bila među tri najstabilnija gena u *Picea abies* (de Vega-Bartol i sar. 2013), baš kao i tokom SE u kičici prema *geNorm*-u (**Tabela 23.**). S druge strane, *18S rRNA* se pokazao kao nepouzdan gen za normalizaciju u cDNK kolekciji kičice i klasifikovan je među tri najnestabilnija gena u svim setovima uzoraka, osim u organogenezi po *NormFinder*-u (**Tabela 23.**). Ovaj rezultat je u skladu sa drugim istraživanjima selekcije referentnih gena koji se odnose na SE (Tu i sar. 2007, Lin i Lai 2010, Li i sar. 2021). Ekspresije dve izoforme *Fe-SOD* su značajno varirale u grupama uzoraka, uključujući faze SE i iako su se pokazale stabilno eksprimiranim u longan drvetu (Lin i Lai 2010), ne mogu se preporučiti za normalizaciju *qPCR* rezultata u kičici.

5.4. Identifikacija i validacija ekspresije pretpostavljeno diferencijalno eksprimiranih gena tokom SE iz transkriptoma kičice

Osim svojih lekovitih svojstava, kičica ispoljava i značajnu plastičnost tokom rasta i razvića, što joj omogućava efikasnu regeneraciju putem SE *in vitro* (Barešová i Kaminek 1984, Subotić i sar. 2006, Subotić i sar. 2009a, Filipović i sar. 2015). Ova izražena fleksibilnost je prepoznata i sve više čini kičicu model sistemom u biologiji razvića (Simonović i sar. 2020). Iako je SE u kičici detaljno proučavana na nivou proteina, poput AGP (Trifunović-Momčilov i sar. 2014, Simonović i sar. 2015, Trifunović-Momčilov i sar. 2015, Filipović i sar. 2021), geni koji specifično deluju tokom ovog procesa još uvek nisu dovoljno istraženi. Ovo može biti posledica

nedostatka sekvenciranog genoma i anotacija za genetički slične vrste, kao i poliploidnog karaktera kičice.

Procena promena u ekspresiji gena u odgovoru na fiziološke ili sredinske uslove jedan je od osnovnih ciljeva *RNA-seq* pristupa (Oshlack i sar. 2010). Za identifikaciju gena koji su pretpostavljeno uključeni u SE kod kičice upotrebljeni su objedinjeni podaci iz *de novo* sastavljenog transkriptoma. Upoređivanjem ekspresije na ovaj način moguće je dobiti uvid u aktivnost gena u različitim okolnostima, odnosno identifikovati DEG. Selekcija DEG se izvodi nakon početnih koraka poravnavanja, kvantifikacije i normalizacije transkripata (Raghavan i sar. 2022). Identifikacija DEG tokom SE u kičici zasnivala se na kriterijumima vezanim za razlike u *FPKM* vrednostima transkripata (**Slika 33.**). U tom kontekstu, treba napomenuti da nema puno istraživanja koja se oslanjaju isključivo na razlike u *FPKM* vrednostima pri selekciji DEG. Jedan od takvih primera je identifikacija tkivno-specifičnih gena tokom razvića rizoma kineskog šaša gde su odabrani svi geni sa *FPKM* > 10 i barem tri puta većom ekspresijom u odnosu na ostala tkiva (Hu i sar. 2017). Identifikacija DEG u transkriptomima obično se obavlja pomoću alata koji procenjuju statističku značajnost između razlika u normalizovanim brojevima očitavanja gena (Dündar i sar. 2015). Neki od često korišćenih softvera za selekciju DEG uključuju *DESeq/DESeq2* (Wang i sar. 2010), *edgeR* (Robinson i sar. 2010), *limma-voom* (Law i sar. 2014) i *Cuffdiff* (Trapnell i sar. 2013). Međutim, većina softverskih paketa je prilagođena za uzorke koji se sekvenciraju u više ponavljanja, što kod *C. erythraea* nije slučaj. Različiti pristupi za analizu podataka su razumljivi jer svako istraživanje ima svoje jedinstvene karakteristike i zahteve. Analiza DEG u kičici je zahtevala uzimanje u obzir mnogih faktora, poput eksperimentalnog dizajna, raznovrsnosti uzoraka, tipa podataka i ciljeva istraživanja, kako bi pravilan odabir metodologije omogućio validnu i pouzdanu interpretaciju rezultata.

Na osnovu zadatih parametara vezanih za *FPKM* vrednosti (**Slika 33.**) identifikovano je ukupno 16748 pogodaka, pri čemu najveći broj pripada uzorcima **rl** (51,87%) i **rk** (19,67%), što je očekivano s obzirom na to da se radi o potpuno diferenciranim tkivima. Budući da je SE usko specijalizovani proces, broj DEG u embriogenim tkivima je znatno manji, ukupno 4040 (**Slika 34.**). Neki geni nisu bili jedinstveni za određeni uslov, budući da se neki od uslova delimično preklapaju. Ovi rezultati su u skladu sa drugim projektima koji su se bavili analizom transkriptoma tokom SE, kao što je analiza transkriptoma mangostina (*Garcinia mangostana*) pomoću *Trinity* tehnologije, gde je identifikovano 4001 DEG tokom SE od ukupno 186203 transkripata (Mahdavi-Darvari i Noor 2017). Izdvojeni DEG tokom SE u kičici su na osnovu *FPKM* kriterijuma svrstani u odgovarajuće faze SE: indukcija **ek**, rana faza formiranja **se**, kasna faza formiranja **se**, i posebnu grupu su činila sva embriogena tkiva. Analizom je utvrđeno da se najveći broj jedinstvenih gena specifično aktivira tokom ranog formiranja **se** (1439), slede kasna faza formiranja **se** (1096), dok je najmanji broj gena aktivan tokom najranije faze indukcije **ek** sa 378 identifikovanih gena (**Slika 35.**). Različite grupe gena sa diferencijalnom ekspresijom tokom SE ukazuju da u različitim procesima razvića u kičici postoje raznovrsni transkripcioni obrasci, dok broj jedinstvenih gena u svakoj grupi pruža uvid u specifične biološke procese koji se dešavaju u pojedinim fazama embriogenog razvića.

Za manje od 50% DEG u svakoj fazi SE su pronađeni homolozi u *nt* bazi, dok je taj broj još manji u *Swissprot* bazi (≤ 40 %), sa samo 25,02% anotiranih transkripata u **kse**, što ukazuje na veliki broj sekvenci koje nemaju očigledne homologe (**Tabela 24.**). Ovaj rezultat sugeriše da su neki od tih gena verovatno geni sa novim funkcijama. Problem anotacije je dodatno uvećan usled nedostataka funkcionalnih genomskih podataka u trenutku sprovođenja eksperimenta, koji je dodatno otežao eksperimentalno potvrđivanje predviđenih funkcija gena ili otkrivanje novih funkcija (Cairney i Pullman 2007, Schlögl i sar. 2012, Steiner i sar. 2012, Hedman i sar. 2013).

Rezultati RT-qPCR analize na proširenom setu uzoraka (**Tabela 1.**) uglavnom su potvrdili *FPKM* očekivanja u pogledu trendova ekspresije gena u embriogenim tkivima. Međutim, vrednosti *FPKM* predikcija za većinu gena u uzorcima **rk** i, u manjoj meri, **aplh** često ne odgovaraju stvarnim ekspresionim profilima. U ovim tkivima, *FPKM* vrednosti su često bile izuzetno niske ili van detekcije (**Tabela 26.**). Tumačenje ovako niskih *FPKM* vrednosti je problematično. S jedne strane, *FPKM* = 1 je tipičan prag koji se koristi za razdvajanje eksprimiranih od neeksprimiranih gena u *RNA-seq* projektima (Consortium i sar. 2010, Nagaraj i sar. 2011). S druge strane, neki transkripti, recimo oni koji kodiraju za TF, mogu ostvariti svoje funkcije čak i pri veoma niskim nivoima ekspresije (Wells i sar. 2015). Dobijeni rezultati sugerišu da se *FPKM* predikcije iz transkriptoma mogu koristiti kao smernice za odabir interesantnih genskih kandidata. Međutim, kako bi se precizno odredila ekspresija, potrebno je potvrditi ova predviđanja u stvarnim eksperimentalnim uslovima, pomoću preciznijih metoda kvantifikacije ekspresije kao što je RT-qPCR.

RT-qPCR analiza je potvrdila da neki od genskih kandidata zaista učestvuju u ranim fazama SE u kičici, kao što su indukcija **ek** i rana faza formiranja **se** (**Slika 36.**). Takođe, neki od gena su pretežno aktivni u kasnijim fazama embriogenog razvića sa maksimumom ekspresije u kotiledonarnom stadijumu **se** (**Slika 37.**). Osim toga, registrovana je grupa gena koja pokazuje smanjenje ekspresije tokom SE, kao i geni čija ekspresija nije značajno promenjena u većini uzoraka (**Slika 38.**). Zanimljivo je da mnogi od ovih gena pokazuju diferencijalnu ekspresiju u više od jednog procesa razvića, što ukazuje na njihovu multifunkcionalnost i mogućnost da učestvuju u različitim aspektima tokom biljnog rasta i razvića.

Među genima koji su aktivni tokom SE kod kičice, posebno u ranim fazama, nalaze se dva gena bez dostupne funkcionalne anotacije, označena kao *CeNA1* i *CeNA2* (**Tabela 25.**). Ovi geni su odabrani isključivo na osnovu *FPKM* vrednosti - oba su pokazivala najveću vrednost *FPKM* u **ek**, koja se postepeno smanjivala u **gse** i **kse**, dok su u vegetativnim tkivima imali izrazito nisku ekspresiju ili nisu bili detektovani (**Tabela 26.**, **Tabela 27.**).

Ekspresioni profil gena *CeNA1* se pokazao kao najinteresantniji u kontekstu istraživanja SE u kičici. Ekspresija *CeNA1* u **ek** ne samo da je značajno veća u poređenju sa ostalim genskim kandidatima, već je oko milion puta veća od ekspresije u kontrolnom uzorku **rl** (**Slika 36.**). Ćelije kalusa nastaju kao posledica intezivnih deoba somatskih ćelija koje su kultivisane *in vitro* pod odgovarajućim uslovima ili su pretrpele povredu (Long i sar. 2022). Iako ćelije unutar kalusa mogu pokazivati različite stepene diferenciranosti, kalus se najčešće smatra manifestacijom dediferenciranog stanja u ćeliji koje odlikuje visoka stopa proliferacije ćelija (Fehér 2015). Glavna karakteristika dediferencijacije je povlačenje iz prethodnog diferenciranog stanja u manje specijalizovanu formu, gde ćelije stiču kompetentnost i mogu ponovo da uđu u ćelijski ciklus. To dalje određuje njihov dalji tok razvića, bilo u pravcu diferencijacije ka određenim ćelijskim tipovima, ili ka opredeljenju za ćelijsku smrt (Grafi 2004, Grafi i sar. 2011). Izuzetno visok nivo ekspresije *CeNA1* u tkivu **ek**, koji daleko premašuje sve ostale uzorke, ukazuje da je ekspresija ovog gena karakteristična za tranziciju iz somatskog u embriogeno stanje. Osim u **ek**, gen *CeNA1* se eksprimira na visokom nivou i u uzorku drugog tipa kalusa, **ok** (**Slika 36.**). Iako se kalus obrazuje i tokom SE i tokom organogeneze, karakteristike kalusa se razlikuju. SE dovodi do obrazovanja embriogenog kalusa sa osobinama totipotencije koji se dalje razvija u **se**, dok se organogenezom indukuje organogeni kalus za koji se smatra da je pre pluripotentno tkivo (Yumbla-Orbes i sar. 2017, Shin i Seo 2018, Fehér 2019). Tokom razvića embriona, ekspresija *CeNA1* gena je i dalje visoka, ali se postepeno smanjuje u skladu sa porastom diferencijacije tkiva tokom sazrevanja **se** (**Slika 36.**). Naime, pokazano je da u embrionu u stadijumu globule, već započinje prva diferencijacija tkiva dermalnog i vaskularnog sistema (Sato i sar. 1995). Takođe, u potpuno formiranim tkivima biljaka *in vitro* ekspresija *CeNA1* je pala na nivo koji se nije mogao detektovati RT-qPCR metodom (**Slika 36.**).

Visoka ekspresija u nediferenciranim tkivima kalusa koja opada u embrionima, kao i nedetektovana ekspresija u potpuno formiranim tkivima biljaka *in vitro* (**Slika 36.**), ukazuje da aktivnost gena *CeNA1* najverovatnije pozitivno koreliše sa intezivnom proliferacijom ćelija koja se dešava tokom indukcije kalusa, naročito u **ek**. Na osnovu rezultata, može se zaključiti da bi neokarakterisani transkript *CeNA1*, zbog svojih izuzetno neobičnih obrazaca ekspresije, mogao predstavljati novi marker najranije faze SE u kičici. S obzirom na neuobičajen profil ekspresije, *CeNA1* je odabran za dalja istraživanja kako bi se dublje razumela uloga ovog nepoznatog transkripta tokom procesa razvića.

Gen *CeNA2* pokazuje sličan obrazac ekspresije kao *CeNA1* kada su u pitanju embriogena tkiva i **ok**, ali sa smanjenim intenzitetom. Naime, i ovaj gen je najaktivniji u **ek**, pri čemu se ekspresija postepeno smanjuje tokom formiranja **se**. Takođe, ekspresija u **ok** je slična ekspresiji u **ek**. Osim toga, *CeNA2* u većini ostalih uzoraka ima ili jako nisku ekspresiju u nivou kontrole lista ili nižu (**Slika 36.**). Ovi rezultati sugerišu da je nepoznati gen *CeNA2* uključen u SE kod kičice, posebno tokom indukcije **ek** i formiranja mladih embriona gde je potencijalno aktivan tokom ćelijskih deoba. Jedna od značajnijih razlika između gena *CeNA1* i *CeNA2* ogleda se u njihovoj ekspresiji u uzorcima cvetova **pzc** i **pnc**. Dok je gen *CeNA1* aktivan u cvetovima, ekspresija gena *CeNA2* je upadljivo isključena (**Slika 36.**). U ovoj ranoj fazi istraživanja je teško diskutovati o razlozima za ovu razliku, i potrebno je detaljnije okarakterisati ove transkripte kako bi se stekao dublji uvid u njihovu regulaciju.

Zajednička karakteristika raznovrsne familije proteina bogatih glicinom (engl. „*Glycine rich proteins*“, GRPs) je prisustvo domena sa ponavljajućim glicinom (Sachetto-Martins i sar. 2000). Prvobitno su opisani GRP proteini locirani u ćelijskom zidu (Varner i Cassab 1986, Keller i sar. 1989), pa se oni uglavnom povezuju sa strukturnim funkcijama. Međutim, raznovrsnost u strukturi, obrascima ekspresije i unutarćelijskoj lokalizaciji biljnih GRP ukazuje da ovi proteini obavljaju veoma različite funkcije u biljkama (Sachetto-Martins i sar. 2000, Mangeon i sar. 2010). U transkriptomu kičice je identifikovan gen *CeGRP3-like* sa najvišom *FPKM* vrednošću u **ek** (*FPKM* =14,89, (**Tabela 26.**, **Tabela 27.**) i homologijom sa genom *GRP3-like* iz *Nicotiana sylvestris* (**Tabela 25.**). Rezultati RT-qPCR analize jasno ukazuju na značajne promene u ekspresiji ovog gena tokom različitih faza SE u kičici (**Slika 36.**). Ovaj gen pokazuje visoku ekspresiju u **ek**, koja se upadljivo isključuje tokom početka razvića **se**, što sugeriše da je *CeGRP3-like* aktivan u ćelijama koje prolaze kroz dediferencijaciju, pre nego što započne formiranje embriona. *GRP* geni predstavljaju izuzetno raznovrsnu grupu gena, među kojima je do sada identifikovano nekoliko njih koji imaju ulogu u procesu SE (Sachetto-Martins i sar. 2000). Prvi izolovani *GRP* gen, *CEM6* iz šargarepe (*Daucus carota* L.), koji kodira za protein ćelijskog zida, diferencijalno se eksprimira tokom ranih faza SE (Sato i sar. 1995). *Northern blot* analiza je pokazala da je *CEM6* predominantno aktivan od globularne do srcaste faze, pri čemu ekspresija postepeno opada tokom razvića **se** (Sato i sar. 1995). Visoka aktivnost gena *GRP5*, koji kodira za protein sličan CEM6, uočena je u svim ćelijama proembriogene mase i **se** do stadijuma torpeda, dok se tokom tranzicije ka kotiledonarnom stadijumu, ekspresija postepeno isključivala (Magioli i sar. 2001). Ekspresioni profil *CeGRP3-like* tokom SE sugeriše da ovaj gen učestvuje u ranim događajima u ćelijama koji su neophodni za ulazak u embriogeni program, verovatno kao odgovor na rani signal koji kontroliše diferencijaciju embriona. Druga najviša ekspresija *CeGRP3-like* uočena je u uzorku **pck** (**Slika 36.**). S obzirom na to da u drugim uzorcima korenova (**rk**, **kk**) ima nešto nižu ekspresiju, ova povećana ekspresija u korenovima iz prirode ukazuje na verovatnu ulogu ovog gena tokom odbrane od patogena. Neki od pronađenih *GRP* gena se eksprimiraju u korenu i imaju antimikrobnu aktivnost. Jedan od njih je *CbGRS1* iz vrste *Capsella bursa-pastoris* koji kodira za dva peptida nazvana Sheperin I i II koja su pokazala aktivnost u odbrani protiv različitih bakterija i gljiva (Park i sar. 2000).

Protein bogat prolinom sa molekulskom masom od 14 kDa, poznat kao DC2.15, prvi put je identifikovan tokom inicijacije SE u suspenziji ćelija šargarepe, nakon uklanjanja 2,4-D iz podloge (Aleith i Richter 1991). Njegova ekspresija je najpre povezana sa početnim morfogenetskim događajima u SE, posebno tokom globularnog i stadijuma srca (Aleith i Richter 1991). Srodni geni su kasnije izolovani iz različitih biljnih vrsta (Holk i sar. 2002). Prisustvo signalnog peptida na N-terminusu, regije bogate prolinom, i dugog hidrofobnog dela na C-terminusu sugeriše da ovi proteini imaju ulogu u povezivanju ćelijskog zida i membrane, doprinoseći adheziji ćelija, signalizaciji i održavanju strukture ćelije (Holk i sar. 2002).

Transkript kičice *CeDC2.15-like*, sa slabom homologijom prema *DC2.15-like* transkriptu iz masline (*Olea europaea*, **Tabela 25.**) pokazuje najveću *FPKM* vrednost u **ek** (*FPKM*=83,16), koja postepeno opada tokom kasnijih faza SE (**Tabela 26.**, **Tabela 27.**). Rezultati RT-qPCR analize su potvrdili *FPKM* očekivanja – aktivnost *CeDC2.15-like* se snažno indukuje tokom formiranja **ek**, sa čak 1000 puta većom ekspresijom u **ek** u odnosu na kontrolu. Visoka ekspresija takođe je zabeležena u **gse**, a zatim drastično opada u **kse** (**Slika 36.**). *CeDC2.15-like* je najverovatnije aktivan u ćelijama kalusa i mladim embrionima koji prolaze kroz prve anatomske modifikacije koje dovode do formiranja zrelih somatskih embriona. Ovo može biti povezano sa intenzivnim ćelijskim deobama, kao što je poznato da proteini bogati prolinom verovatno doprinose sintezi novog ćelijskog zida (Lin i sar. 1996). Yasuda i sar. (2001) su identifikovali *DC2.15* u šargarepi koji je imao drugačiji obrazac ekspresije tokom SE u odnosu na prvobitno opisani *DC2.15* (Aleith i Richter 1991). Transkripti su se akumulirali pre svega u najranijim ćelijskim klasterima i bili prisutni u niskim nivoima u embrionima u stadijumu srca i torpeda, kao i u neembriogenim ćelijskim kulturama u suspenziji (Yasuda i sar. 2001). Transkripcija *CeDC2.15-like* nije ograničena samo na rane faze SE, već se snažno indukuje i u uzorcima korenova gajenih *in vitro* (**rk** i **kk**, **Slika 36.**). Ispitivanja ekspresije gena sa visokom homologijom prema *DC2.15* pokazala su da ovi geni učestvuju u mnogobrojnim procesima u biljkama, pa je tako zabeležena visoka ekspresija *RCc3* u korenu pirinča (Xu i sar. 1995), *SAC51* u mahunama uljane repice (Coupe i sar. 1993), saharozom indukovana ekspresija iRNK koja kodira za protein od 14 kDa (Hotze i sar. 1994) i snižena ekspresija *ADR11-2* u hipokotilima soje pod uticajem auksina (Datta i sar. 1993). Još jedan gen sličan *DC2.15*, *PVR5*, pokazuje specifičnu ekspresiju u korenu pasulja, koja je zavisna od stadijuma razvića korena (Choi i sar. 1996). Dodatno, ovaj gen je preferencijalno aktivan u korenovima biljaka koje su gajene u Hoaglandovom rastvoru, međutim u celokupnom korenovom sistemu biljaka iz prirode u fazi razvića mahuna nije detektovana ekspresija. Slično je uočeno u kičici u korenovima iz prirode (**pck**), gde je ekspresija gena *CeDC2.15-like* bila izuzetno niska, niža u odnosu na kontrolu lista (**Slika 36.**). Kada se sve ove informacije uzmu u obzir, jasno je da ova grupa gena ima raznovrsne funkcije u biljkama. Diferencijalna ekspresija gena *CeDC2.15-like* u embriogenim tkivima (**ek** i **gse**) i uzorcima korenova iz kulture *in vitro* (**rk**, **kk**) u kičici sugeriše na moguću specifičnost i regulaciju gena *CeDC2.15-like* u različitim fazama razvića, što može ukazivati na njegovu potencijalnu ulogu u odgovoru na specifične fiziološke zahteve biljaka u različitim uslovima.

Poznato je da biosinteza i signalni putevi etilena mogu da utiču na indukciju SE i formiranje **se**, iako molekularni mehanizmi koji leže u osnovi ovih procesa još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (Hatanaka i sar. 1995, El Meskaoui i sar. 2000, Mantiri i sar. 2008). Istraživanja su pokazala da biosinteza i percepcija etilena dovode do indukcije SE kod *Medicago truncatula* (Mantiri i sar. 2008) i inicijacije embriogenog kalusa i sazrevanja embriona kod *Medicago sativa* (Kepczynski i sar. 1992, Kępczyńska i sar. 2009). Ekspresija gena *CeACS3*, koji pretpostavljeno kodira za enzim ACS3 koji učestvuje u biosintezi etilena (**Tabela 25.**), povećava se tokom indukcije **ek** kod kičice, a zatim opada tokom formiranja **se**, dostižući nivo kontrole u **kse** (**Slika 36.**). Indukovana ekspresija *CeACS3* tokom inicijacije SE u kičici najverovatnije je posledica prisustva egzogenog auksina. Primena egzogene IAA stimuliše biosintezu etilena

povećavajući transkripciju gena *ACS* u *A. thaliana* (Abeles i sar. 1992, Abel i sar. 1995, Tsuchisaka i Theologis 2004, Che i sar. 2006). Slično tome, primena 2,4-D aktivira signalne puteve koji utiču na biosintezu i signalne puteve etilena, što dovodi do povišene ekspresije *ACS* i pojačane sinteze etilena (Su i Zhang 2014). Rezultati ukazuju da povećana ekspresija *CeACS3* u **ek** može biti rezultat delovanja 2,4-D na biosintezu etilena putem auksinskog signalnog puta u kičici. Međutim, Bai i sar. (2013) su prijavili suprotne rezultate gde je za indukciju SE u *A. thaliana* bila neophodna inhibicija biosinteze etilena. Analiza transkriptoma je pokazala da se ekspresija gena *ACS2*, *ACS6* i *ACS8* smanjuje tokom indukcije SE, a nakon uklanjanja 2,4-D. Tokom kasnijih faza SE, biosinteza etilena se i dalje smanjuje, što je neophodno za lokalnu biosintezu auksina i formiranje **se** (Bai i sar. 2013). Moguće je da je inicijalni porast sinteze etilena u **ek** kod kičice posledica egzogene 2,4-D, a da je smanjen sadržaj etilena neophodan za formiranje **se**. Može se zaključiti da je ekspresija gena *CeACS3* tokom SE u kičici posledica složene međusobne regulacije između auksina i etilena i da su interakcije između ovih hormona značajne u određivanju putanja razvića embriona. Osim visoke ekspresije u **ek**, visoka ekspresija *CeACS3* je zabeležena i u uzorku korenova iz prirode, **pck** (**Slika 36.**). Prethodna istraživanja na korenu sitkanske smrče su pokazala da napadi insekata ili mehaničke povrede izazivaju jaku indukciju gena *ACS3* i *ACS2* (Ralph i sar. 2007), što sugeriše da visoka ekspresija *CeACS3* u **pck** može biti posledica postojanja sličnog odbrambenog mehanizma u kičici.

Proteini povezani sa patogenima (engl. „*Pathogenesis-Related*“, PRs) su deo odbrambenih odgovora biljaka. PR proteini su kodirani genima koji se brzo indukuju u odgovoru na biotički i abiotički stres i na akumulaciju hormona koji su povezani sa odbrambenim mehanizmima biljaka (Narusaka i sar. 2009). Ovi proteini su podeljeni u 17 familija na osnovu strukture, bioloških funkcija i enzimskih svojstava (Van Loon i Van Strien 1999). PR-5 proteini su uglavnom ekstracelularni i imaju visoku aminokiselinsku homologiju sa proteinom slatkog ukusa, taumatinom, prvobitno nađenom u južnoafričkoj bobici *Thaumatococcus daniellii* (van der Wel i Loeve 1972), pa su poznati i kao taumatinu slični proteini (engl. „*Thaumatin-Like Protein*“, TLP). U transkriptomu kičice je identifikovan *CeTLP1-like* gen sa najvećom *FPKM* vrednošću u **kse** (*FPKM* = 17,78, **Tabela 26.**, **Tabela 27.**). PR10 proteini strukturno nisu povezani ni sa jednom drugom klasom PR proteina i osim direktnih uloga u odbrani, ovi proteini su uključeni u odgovore na stres, kao i tokom fizioloških promena u određenim stadijumima razvića (Maillot i sar. 2009, Lebel i sar. 2010, Fernandes i sar. 2013). Utvrđeno je da *CePR10* verovatno kodira protein strukturno povezan sa alergenima hrane i polena drveća, blizak Betv1 alergenu iz breze (Breiteneder i sar. 1989), sa najvećim *FPKM* vrednostima u embriogenim tkivima i maksimumom u **ek** (*FPKM*=2056,18, **Tabela 26.**, **Tabela 27.**).

Oba testirana *PR* gena se eksprimiraju tokom SE u kičici, ali je obrazac transkripcije prostorno drugačiji. *CeTLP1-like* se eksprimira u svim stadijumima SE sa maksimumom u **kse**, dok je *CePP10* aktivan u ranoj SE, do globularnog stadijuma embriona, nakon čega se isključuje (**Slika 36.**, **Slika 37.**). Osim toga, uočeno je da ekspresiju *CeTLP1-like* u uzorcima tkiva u kulturi *in vitro* očigledno indukuje prisustvo 2,4-D, što se može zaključiti i za *CePR10*, iako u manjoj meri. Indukcija određenih odbrambenih reakcija nije iznenađujuća; poznato je da 2,4-D izaziva oksidativni stres u tretiranim tkivima (Romero-Puertas i sar. 2004). U kulturama vinove loze je došlo do snažne akumulacije različitih proteina odbrane nakon tretmana sa 2,4-D (Marsoni i sar. 2008). Veza između stresa i SE je dobro dokumentovana, budući da se SE takođe indukuje kod nekih biljnih vrsta korišćenjem stimulusa poput povređivanja, visokih koncentracija soli, jona teških metala ili osmotskog šoka (Feher i sar. 2003, Quiroz-Figueroa i sar. 2006). Zapravo, pretpostavlja se da je SE adaptivni proces na stres, koji proizlazi iz obimne ćelijske reorganizacije i reprogramiranja ekspresije gena u tretiranim tkivima (Feher i sar. 2003, Maillot i sar. 2009).

Iako većina PR proteina pokazuje antimikrobnu aktivnost, mnoga istraživanja ukazuju i na moguću dodatnu ulogu u razviću biljaka, uključujući i SE (Maillot i sar. 2009). Visoka ekspresija *PR10* je zabeležena tokom indukcije SE kod *M. truncatula*, kako u embriogenoj liniji sa jakim odgovorom (2HA), tako i sa slabim odgovorom (*Jemalong*), što ukazuje da PR10 proteini mogu pozitivno uticati na indukciju SE, ali da verovatno ne deluju samostalno na indukciju prelaska u embriogeno razviće (Imin i sar. 2005). Tokom SE u *Quercus suber* identifikovana su dva PR5 proteina sa najvećim sadržajem u tkivima rane faze SE. Oba su pokazala značajan opadajući trend od početnih do kasnih faza SE (Gomez-Garay i sar. 2013). Moguće je da PR proteini ostvaruju svoju ulogu u SE kod kičice tako što interferiraju sa intracelularnim transportom hormona. Pokazano je da su PR10 najzastupljeniji proteini indukovani tretmanom 2,4-D koji vodi ka SE kod *M. truncatula* je (Imin i sar. 2005, De Jong i sar. 2007). Osim toga, *PR10* gen je bio snažno eksprimiran tokom indukcije SE u detelini, počevši od protoplasta: prvi puls transkripcije se pojavio nakon aplikacije 2,4-D i interpretiran je kao odgovor na stres; drugi puls se pojavio kasnije, tokom diferencijacije embriona, što sugeriše na dodatnu ulogu u morfogenezi (Domoki i sar. 2006), iako to kod kičice nije slučaj. Dodatno, povećana ekspresija *PR10* gena u transgenom grašku dovela je do povećanja sadržaja citokinina i smanjenja nivoa ABA, što ukazuje na to da promene u akumulaciji PR10 proteina mogu biti relevantne za regulaciju hormona (Srivastava i sar. 2006). Slično je pokazano i za gene *TLP*; dva transkripta slična *TLP* genima iz ćelijskih klastera najranije faze SE šargarepe preferencijalno se nakupljaju u embriogenim ćelijskim klasterima formiranim nakon tretmana sa 2,4-D (Yasuda i sar. 2001).

Pored toga što su aktivni u određenim fazama SE, *CePR10* i *CeTLP1-like* geni pokazuju visoku ekspresiju u korenovima cvetalih biljaka, koja je u nivou **ek** (**Slika 36.**, **Slika 37.**). Povišena ekspresija u **pck** je najverovatnije rezultat indukcije osnovnog odbrambenog odgovora koji se aktivira u odgovoru na prisustvo patogena u zemljištu ili neki tip abiotičkog stresa. U vinovoj lozi, *PR10.1* je pokazao povećanu aktivnost tokom interakcije sorte „*Ugni blanc*“ sa *P. syringae* (Robert i sar. 2001), dok je ekspresija nekoliko *PR10* gena bila indukovana u sorti „*Cabernet-Sauvignon*“ nakon fungalne infekcije (Fung i sar. 2008). Osim toga, *PR10* se snažno eksprimira u listovima sorte „*Riesling*“ koji su bili inficirani sa *Plasmopara viticola* (Polesani i sar. 2008). *TLP* geni se takođe eksprimiraju u odgovoru na napad patogena i abiotički stres (de Jesús-Pires i sar. 2020). Misra i sar. (2016) su identifikovali i okarakterisali *TLP1* iz bosiljka (*Ocimum basilicum*), čija je prekomerna ekspresija u *A. thaliana* rezultirala u povećanoj otpornosti na fungalne patogene (*Scleretonia sclerotiorum* i *B. cinerea*) i toleranciji na abiotički stres (sušu i visok salinitet). Prekomerna ekspresija gena *TLP* izolovanog iz kruške *Pyrus pyrifolia*, u duvanu, dovela je do povećane *in vitro* aktivnosti protiv gljiva *S. sclerotiorum*, *Phomopsis* sp., *P. parasitica* var. *nicotianae* i *Alternaria* sp. (Liu i sar. 2012). Osim toga, transgena linija uljane repice (*Brassica napus*), koja je transformisana *TLP* genom izolovanim iz ječma (*Hordeum vulgare*), pokazala je povećanu otpornost na patogena iz zemlje *Plasmodiophora brassicae* (protozoa) (Reiss i sar. 2009).

Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da geni koji kodiraju za proteine odbrane, CePR10 i CeTLP1, učestvuju u nekoliko procesa u kičici. Gen *CePR10* najverovatnije učestvuje u indukciji **ek** i formiranju mladih embriona, dok bi *CeTLP1* mogao imati regulatornu ulogu u više stadijuma SE. Osim toga, oba gena se značajno eksprimiraju u **pck**, što je u skladu sa njihovom osnovnom ulogom tokom biotičkog i abiotičkog stresa.

Još jedan neanotirani transkript, označen kao kao *CeNA4*, izabran je za analizu ekspresije u tkivima i organima kičice, s obzirom na najvišu *FPKM* vrednost u uzorku **kse** (*FPKM*=10,84) i *FPKM* < 1 u ostalim tkivima (**Tabela 26.**, **Tabela 27.**). Rezultati RT-qPCR analize ukazuju na postepeno povećanje ekspresije gena *CeNA4* od **ek** ka **kse**, gde dostiže svoj maksimum (**Slika 37.**). Ova tendencija dostizanja maksimalne ekspresije u **kse** ukazuje na potencijalnu ulogu

ovog gena u procesu diferencijacije i formiranja embriona, ili možda u sazrevanju **kse**. Međutim, s obzirom na neokarakterisanu sekvencu ovog gena, ovo su samo preliminarne pretpostavke o njegovoj mogućoj funkciji koje bi trebalo dodatno istražiti u budućnosti.

IPA put se smatra najvažnijim putem biosinteze endogene IAA, gde enzim TAA1/TAR1 konvertuje triptofan u indol-3-piruvat, a zatim proteini YUC pretvaraju indol-3-piruvat u IAA (Kasahara 2015). *CeYUC7* pretpostavljeno kodira za flavin-monooksigenazu YUC7, koja pripada IPA putu (Lee i sar. 2012); međutim osim niske *FPKM* vrednosti u **kse** (*FPKM*=1,67), ekspresija *CeYUC7* nije detektovana ni u jednom drugom tkivu (**Tabela 26.**, **Tabela 27.**). RT-qPCR analiza je pokazala da je ekspresija gena *CeYUC7* jako niska u ranim fazama SE (**ek**, **gse**), u nivou kontrole, dok se snažno aktivira u obrazovanim **kse**, gde dostiže slično visok nivo ekspresije kao u **kl** (**Slika 37.**). Lee i sar. (2012) su pokazali da aktivacija *YUC7* gena povećava otpornost na sušu u *A. thaliana*, i da funkcioniše na ABA-zavisni način. Kod mutanta *yuc7-1D*, sa pojačanom ekspresijom *YUC7* u uslovima suše, dolazi do povećanja ukupnog sadržaja endogene IAA i otpornosti na stres izazvan sušom, što je u skladu sa povišenim nivoom ekspresije nekoliko gena koji reaguju na sušu i većim brojem lateralnih korenova u uslovima suše. Ova zapažanja ukazuju da povećana ekspresija *CeYUC7* u **kse** može ukazivati na moguću povezanost sa adaptivnim odgovorom na uslove stresa, uključujući isušivanje, kroz koje embrioni prolaze tokom poslednje faze sazrevanja (Joshi i sar. 2022).

Osim u **ek** i **gse**, i u većini drugih uzoraka tkiva koja su bila pod dejstvom egzogene 2,4-D primećuje se trend smanjene ekspresije gena *CeYUC7* (**Slika 37**.). Ovo je najverovatnije posledica mehanizma kojim se obezbeđuje da biljke ne akumuliraju previše indol-3-piruvata, čime se održava homeostaza IAA. U embriogenom kalusu *A. thaliana*, koji je indukovan pomoću 2,4-D tokom 14 dana, nakon čega je 2,4-D uklonjen iz podloge, primećeno je dramatično (*YUC1* i *YUC2*) ili umereno (*YUC3* i *YUC6*) povećanje ekspresije *YUC* gena (Bai i sar. 2013). Međutim, tokom kontinuiranog gajenja kalusa na podlozi sa 2,4-D, nije došlo do povećanja ekspresije *YUC* gena. U skladu sa obrascima ekspresije *YUC* gena, nivoi slobodnog auksina/IAA u embriogenom kalusu su se povećali nakon uklanjanja 2,4-D iz podloge, za razliku od kontinuiranog gajenja na podlozi sa 2,4-D, kada nivoi IAA nisu pokazali povećanje (Bai i sar. 2013). Ovi rezultati ukazuju da uklanjanje 2,4-D iz podloge dovodi do povećanja nivoa endogenih auksina/IAA u embriogenom kalusu, a to je posledica povećane ekspresije gena za biosintezu auksina, poput *YUC* gena. Suzuki i sar. (2015) su pokazali da primena sintetičkih auksina 2,4-D i naftilsirćetne kiseline (NAA) smanjuje transkripciju gena *YUC1*, *YUC2*, *YUC4* i *YUC6* i *TAR2* u klijancima *A. thaliana*, dok se primenom inhibitora biosinteze auksina transkripcija istih povećava. Snižena ekspresija *CeYUC7* u tkivima kičice koja su bila pod konstantnim uticajem 2,4-D tokom četiri nedelje sugerišu da je ovaj ovaj gen uključen u IPA put biosinteze auksina transkripciono regulisan putem negativne povratne sprege sa nivoom aktivne IAA. Još jedno interesantno zapažanje vezano za ekspresioni profil *CeYUC7* je njegova upadljivo niska aktivnost u organima iz prirode, ispod nivoa kontrole (**Slika 37.**). Ovaj rezultat je u saglasnosti zapažanjima Lee i sar. (2012) koji su ustanovili da *YUC7* tokom razvića biljaka u normalnim uslovima rasta ima veoma nisku ekspresiju.

Članovi *GH3* familije gena spadaju među gene koji najbrže reaguju u odgovoru na prisustvo auksina (Hagen i Guilfoyle 2002, Staswick i sar. 2005). Ovi geni kodiraju za amidosintetaze acilne kiseline koje učestvuju u regulaciji metabolizma auksina tako što sintetišu konjugate IAA sa ak, što je jedan od glavnih mehanizama za održavanje homeostaze auksina (Sherp i sar. 2018). Ekspresija gena *CeGH3.6* u embriogenim tkivima kičice je najintenzivnija u kasnom stadijumu formiranja embriona (**kse**), a sličan intenzitet ekspresije je primećen i u uzorku **aplh** (**Slika 37.**). Povećana aktivnost *CeGH3.6* u uzorcima **kse**, **aplh** i u manjoj meri u većini drugih uzoraka gajenih *in vitro* odražava povećan sadržaj konjugata IAA u **kse**, koji je verovatno posledica povećanog sadržaja auksina i ima ulogu u regulisanju prisustva

viška auksina u biljci. Iako pravi konjugate sa nekoliko ak, *GH3.6* najsnažnije interaguje sa asparaginskom kiselinom (Asp). Za razliku od konjugacije sa ugljenim hidratima, konjugacija sa Asp nije podložna hidrolizi, već degradaciji, te ima ulogu u detoksikaciji tkiva od prekomernih koncentracija IAA (Nakazawa i sar. 2001, Staswick i sar. 2005). Međutim, ovo povećanje konjugata IAA u tkivima kičice verovatno zavisi od povećanog sadržaja endogenih auksina, a ne od prisustva 2,4-D. Naime, pokazano je da iako se *GH3.6* brzo i snažno aktivira u prisustvu auksina kao što su IAA ili NAA, sintetički auksini 2,4-D i dikamba nisu pokazali sposobnost da indukuju transkripciju *GH3.6* (Nakazawa i sar. 2001, Staswick i sar. 2005). Moguće je da zbog stalno prisutne 2,4-D biljka nema pojačane potrebe za endogenim auksinima, pa ih onda vezuje u konjugate, a za to je neophodna ekspresija *CeGH3.6.*

Različiti *GH3* geni često variraju u prostornoj i vremenskoj ekspresiji (Rampey i sar. 2004). Ekspresija *GH3.6* je zabeležena u kotiledonima, odraslim listovima, hipokotilima i svim delovima korenova (Staswick i sar. 2005). U GH3 sintetazama *A. thaliana* ne postoje značajnije razlike u specifičnosti za supstrat (Nakazawa i sar. 2001), te se može pretpostaviti da je razlog postojanja više gena u familiji pre povezan sa tkivno-specifičnim ili funkcijama tokom razvića nego sa različitim biohemijskim svojstvima samih enzima. U uzorcima organa iz prirode kod kičice, *CeGH3.6* ima uglavnom sniženu ekspresiju u odnosu na kontrolu lsta, osim povišene ekspresije u uzorcima **pzc** i **pnc** (**Slika 37.**). Na osnovu literaturnih podataka, do sada nije zabeležena ekspresija *GH3.6* gena u cvetovima (Nakazawa i sar. 2001, Staswick i sar. 2005).

Aux/IAA proteini su dobro poznati kao proteini koji se brzo aktiviraju u prisustvu auksina i učestvuju u signalizaciji auksina putem interakcije sa ARF proteinima kao transkripcioni represori (Abel i sar. 1995, Lavy i Estelle 2016, Li i sar. 2016). Regulacijom ARF aktivnosti, geni *Aux/IAA* predstavljaju ključne komponente u putevima transdukcije signala auksina, kontrolišući preciznu ekspresiju gena neophodnu za pravilan rast, razvoj biljaka i adaptaciju na spoljašnje stimuluse. Gen *CeIAA32* iz transkriptoma kičice iz *Aux/IAA* grupe gena (**Tabela 25.**), ima niske *FPKM* vrednosti i maksimum ekspresije u **kse** (*FPKM*=7,98, **Tabela 26.**, **Tabela 27.**). Rezultati RT-qPCR analize prema kojima ekspresija *CeIAA32* blago raste prateći tranziciju iz **ek** u **kse** ukazuje da *CeIAA32* spada u gene koji su aktivni tokom SE kod kičice (**Slika 37.**). Tokom indukcije SE u *A. thaliana* uočena je diferencijalna ekspresija gena iz ove grupe (*IAA16*, *IAA29*, *IAA30*, *IAA31*), a u skladu sa ovim posmatranjima, primećeno je da mutacije u dva od ovih gena, *IAA30* i *IAA31*, dovode do značajnih defekata u embriogenom odgovoru u tkivima gajenim *in vitro* (Gliwicka i sar. 2013). Pretpostavlja se da Aux/IAA-ARF posredovani odgovori na auksin takođe imaju ulogu u embriogenim kulturama drugih biljaka, uključujući pamuk (Wu i sar. 2009, Yang i sar. 2012), pirinač (Su i sar. 2007) i ciklamu (Rensing i sar. 2005). Ekspresija gena *CeIAA32* u kičici tokom svih faza u SE ističe važnost signalizacije auksina u kontroli indukcije i razvića **se**. Pored toga, ekspresioni profil *CeIAA32* ukazuje na to da je aktivniji tamo gde se pretpostavlja da ima više slobodnog auksina - u uzorcima **ok**, **rk**, **kl**, kao i u tkivima koja su bila pod uticajem egzogenih auksina, kao što su embriogena tkiva. Ovo zapažanje je dodatno potvrđeno nižom ekspresijom u spontano indukovanim tkivima (osim u **rk**), a posebno izrazito niskom ekspresijom u uzorcima iz prirode (u nivou kontrole, **Slika 37.**). Uzrok tome je verovatno činjenica da oni nisu bili pod uticajem egzogene 2,4-D. Prethodna istraživanja su pokazala da je ekspresija *Aux/IAA* gena često brzo indukovana u prisustvu egzogenog auksina (Theologis i sar. 1985, Oeller i sar. 1993, Yamamoto i Yamamoto 1998), pri čemu se ovi geni razlikuju u osetljivosti i prirodi svog odgovora na auksin (Liscum i Reed 2002). Takođe, ekspresija specifične grupe gena *Aux/IAA* može značajno varirati između različitih biljnih vrsta, pa čak i unutar različitih tkiva iste biljke (Jain i Khurana 2009, Rademacher i sar. 2011). Ova zapažanja su u skladu sa ekspresionim profilom *CeIAA32*, čija ekspresija nije ograničena na proces SE, već je on aktivan i u drugim tkivima sa višim sadržajem auksina, kao što su **kl**, **ok** i **rk** (**Slika 37.**).

Pored gena koji se pojačano eksprimiraju tokom ranih ili kasne faze SE, neki od gena pokazuju sniženu ekspresiju u uzorcima embriogenih tkiva (**Slika 38.**). *CeAGL65-like* pretpostavljeno kodira TF sa MADS domenom i ima maksimum *FPKM* vrednosti u **kse** (*FPKM*=6,91, **Tabela 25.**, **Tabela 26.**, **Tabela 27.**). Poznato je da su TF iz ove grupe uključeni u regulaciju različitih razvojnih procesa u biljkama kao što su kontrola vremena cvetanja, regulacija organogeneze cveta, razviće plodova i sazrevanje semena (Parenicova i sar. 2003). Dodatno, gen iz *AGL* porodice, *AGL15*, poznat je kao jedan od centralnih regulatora indukcije SE koju ostvaruje kroz interakciju sa brojnim TF i regulaciju signalne transdukcije auksina, etilena, GA i BR (Joshi i sar. 2022). Međutim, rezultati RT-qPCR analize su pokazali da *CeAGL65-like* gen u većini testiranih uzoraka tkiva i organa kičice ima izuzetno nisku ekspresiju, uglavnom nižu od kontrole lista, uključujući i embriogena tkiva (**Slika 38.**). *CeAGL65-like* se najviše (iako niskim intenzitetom) eksprimira u uzorku **pnc** (**Slika 38.**). Ovo ukazuje na moguću povezanost između procesa sazrevanja semena u nezrelim cvetovima i ekspresije ovog gena. Luo i Di (2023) su pomoću *RNA-seq* pronašli i RT-qPCR metodom potvrdili diferencijalnu ekspresiju *AGL65* tokom razvića cvetova u *Angelica sinensis.* Osim toga, *AGL65* spada u jednu od grupa gena koje regulišu cvetanje tokom vernalizacije, odnosno utiču na identitet cvetnog meristema (Luo i Di 2023). Ekspresioni profil *CeAGL65-like* sugeriše da je ovaj gen verovatno deo regulatorne mreže koja kontroliše cvetanje kod kičice.

Sposobnost somatskih ćelija da reprogramiraju razviće ka embriogenom podrazumeva sticanje embriogene kompetencije i često se indukuje stresom ili tretmanom RRB, najčešće 2,4-D (Feher i sar. 2003, Gaj 2004). Embriogena kompetencija obično podrazumeva pojačanu ekspresiju *SERK* gena koji kodiraju za transmembranske receptorske kinaze bogate leucinom (Soltabayeva i sar. 2022). Ekspresija *SERK* gena zabeležena je u zigotskim i **se** brojnih biljnih vrsta (Schmidt i sar. 1997, Somleva i sar. 2000, Hecht i sar. 2001, de Oliveira Santos i sar. 2005, Hu i sar. 2005). Osim toga, pokazano je da prekomerna ekspresija *SERK1* povećava embriogeni odgovor u *A. thaliana* (Hecht i sar. 2001). Zbog toga se *SERK* smatra markerom embriogene kompetencije u biljkama (Maillot i sar. 2009). U transkriptomu kičice identifikovana su dva *SERK* gena: *CeSERK1*, homolog sa *SERK1* u *A. thaliana* i gen *CeSERK* (**Tabela 25.**). Iako je *CeSERK1* pronađen na osnovu zadatih parametara filtriranja, njegova ekspresija ima jako niske vrednosti *FPKM*, sa maksimalnom vrednošću od *FPKM*=2,20 u **gse** (**Tabela 26.**, **Tabela 27.**). Rezultati RT-qPCR analize su delimično potvrdili ove predikcije, pokazujući nisku ekspresiju u svim ispitivanim uzorcima, u nivou kontrole ili čak nižu (**Slika 38.**). Ovi rezultati sugerišu da pri izboru markera za neki biološki proces treba preferirati izbor transkripata sa većim *FPKM* vrednostima, jer su transkripti sa niskim *FPKM* vrednostima verovatno od manjeg biološkog značaja (Wells i sar. 2015). Neki od tih transkripata mogu imati lažno niske ili nulte vrednosti ekspresije zbog nepotpunog sastavljanja ili nepokrivenosti oba kraja očitavanja, te se stoga ne mogu sa sigurnošću uzeti u obzir. Kako bi se prevazišao ovaj problem, odabran je još jedan *CeSERK* transkript koji nije zadovoljio zadate parametre filtriranja, već je izabran na osnovu većih i relativno konstantnih *FPKM* vrednosti u svim tkivima (**Tabela 26.**, **Tabela 27.**). Za razliku od *CeSERK1*, ekspresija gena *CeSERK* bila je viša i prilično ujednačena u većini ispitivanih tkiva (**Slika 38.**), što ukazuje na to da ekspresija ovog gena nije ograničena samo na proces SE u kičici. Ova zapažanja su u skladu sa istraživanjima na *A. thaliana* i vinovoj lozi koja su pokazala da *SERK1* i *SERK2* deluju prevashodno u embriogenezi (Colcombet i sar. 2005), dok je *SERK3* uglavnom uključen u odbranu od patogena i signalizaciju BR (Nam i Li 2002). Dodatno, otkriveno je da se *SERK* geni u kukuruzu eksprimiraju i u neembriogenom kalusu (Zhang i sar. 2011). Dobijeni rezultati potvrđuju da isti geni mogu imati različite uloge u biljci, kao i da nijedan od izabranih *CeSERK* gena nije marker SE u kičici. Testirani *SERK* geni su odabrani zbog njihovih sličnih sekvenci u odnosu na *SERK* gene prisutne u *A. thaliana*. Međutim, ne treba isključiti mogućnost da bi odabir gena s drugačijim sekvencama, npr. daljih rođaka ovih gena, mogao dovesti do pojačane ekspresije u embriogenim tkivima kičice.

PCC13-62 spada u proteine povezane sa desikacijom (engl. „*Desiccation-Related Proteins*“, DRPs) (Bartels i sar. 1990, Ditzer i sar. 2001, Rodrigo i sar. 2004). DRP proteini se mogu podeliti u dve grupe - proteini prve grupe sadrže konzervirane LEA (engl. „*Late Embryogenesis Abundant*“) motive u svojim aminokiselinskim sekvencama i poznati su kao LEA proteini, dok druga grupa nema LEA motive i naziva se LEA-slični DRP. PCC13-62 se svrstava u LEA-slične DRP jer ne poseduje LEA motive, ali deli slične karakteristike sa LEA proteinima i akumulira se tokom desikacije, što je povezano sa tolerancijom na dehidrataciju (Giarola i sar. 2018). *CePCC13-62-like* iz transkriptoma kičice verovatno kodira za protein sličan PCC13-62 proteinu iz paprike *Capsicum annuum* (**Tabela 25.**), sa najvećom pretpostavljenom ekspresijom u **ek** (*FPKM*=30,60, **Tabela 26.**, **Tabela 27.**). Međutim, rezultati RT-qPCR analize nisu potvrdili *FPKM* očekivanja, jer *CePCC13-62-like* pokazuje najniži nivo ekspresije u svim embriogenim tkivima, čak niži od kontrole lista rozete (**rl**). Takođe, ekspresija ovog gena u gotovo svim uzorcima tkiva je niža u odnosu na kontrolu, osim u listovima (**pcl**) i zrelim cvetovima iz prirode (**pzc**) (**Slika 38.**).

Transkripti *PCC13-62* gena se obilno nakupljaju u dehidriranim tkivima biljaka koje su tolerantne na dehidrataciju, kao što su *C. plantagineum i L. brevidens*, dok se u dehidriranim listovima biljaka koja su osetljive na dehidrataciju, kao što je *L. subracemosa* eksprimiraju, ali u znatno manjoj meri (Giarola i sar. 2018). U nekoliko vrsta koje nisu tolerantne na desikaciju, geni *PCC13-62* se uglavnom eksprimiraju u reproduktivnim tkivima i organima koji su generalno tolerantniji na dehidrataciju, kao što su semena i polen (Giarola i sar. 2018). Na osnovu rezultata RT-qPCR analize može se zaključiti da povišena ekspresija *CePCC13-62-like* u uzorku **pcl** proizilazi iz odgovora na dehidrataciju, dok je blago povišena ekspresija u uzorku **pzc** rezultat sazrevanja semena, jer je samo tkivo zrelih cvetova otpornije na isušivanje zahvaljujući akumulaciji LEA proteina.

Ova blago povišena ekspresija se može objasniti nedostatkom selektivnog pritiska za toleranciju na desikaciju u staništu kičice (Šiler i sar. 2007, Živković i sar. 2007). S druge strane, izuzetno niska ekspresija u embriogenim tkivima može se objasniti visokom osetljivošću tih tkiva na dehidrataciju. To sugeriše da je gen *CePCC13-62* možda važan za otpornost na dehidrataciju u specifičnim tkivima i organima, dok je u drugim tkivima njegova ekspresija znatno niža zbog njihove veće osetljivosti na dehidrataciju.

Neki od testiranih gena nisu pokazali značajnije promene u ekspresiji u većini uzoraka tkiva i organa, kao što je gen *CeTAR1* koji pretpostavljeno kodira za enzim TAR1 koji konvertuje triptofan u indol-3-piruvat u IPA putu sinteze auksina (Kasahara 2015). *CeTAR1* ima *SwissProt* homologiju sa *TAA1* i najveću *FPKM* vrednost u **kse** (*FPKM*=9,44), dok je u ostalim tkivima *FPKM* < 1 (**Tabela 25.**, **Tabela 26.**, **Tabela 27.**). U ekspresiji ovog gena u kičici postoje značajne varijacije među biološkim ponavljanjima, pa se rezultati moraju tumačiti sa oprezom (**Slika 38.**). *CeTAR1* ne pokazuje specifičnu ekspresiju u uzorcima tkiva iz SE, a osim toga, i u većini drugih tkiva koja su bila pod dejstvom egzogene 2,4-D primećuje se trend smanjene ekspresije (**Slika 38.**). Primena sintetičkih auksina 2,4-D i NAA dovela je do smanjene ekspresije gena *TAR2* u klijancima *A. thaliana*, dok se primenom inhibitora biosinteze auksina njegova transkripcija povećala (Suzuki i sar. 2015). Dodatno, pod prekomernim tretmanom egzogenim auksinom, gen *TAR2* je inhibiran kako bi se održao balans u koncentraciji auksina u bočnim korenovima u *A. thaliana* (Hu i sar. 2020). Ovo smanjenje je verovatno posledica prethodno opisane negativne povratne sprege koja obezbeđuje da biljke ne akumuliraju previše indol-3-piruvata, čime se održava homeostaza endogenog nivoa auksina (Luo i Di 2023). *CeTAR1* je najaktivniji u uzorcima **pck**, gde verovatno ima ulogu u rastu korena i njegovom grananju. Ovo zapažanje je u skladu sa povećanom ekspresijom *TAR2* u *A. thaliana* koja može biti indukovana nedostatkom azota, što dovodi do biosinteze auksina i veće koncentracije IAA, koja pozitivno utiče na razvoj bočnih korenova (Tao i sar. 2008, Zhao 2012).

RNS3 pripada evoluciono konzerviranoj porodici T2 endoribonukleaza koje katalizuju isecanje jednolančane RNK. T2 endoribonukleaze ostvaruju raznovrsne funkcije u više fizioloških procesa kod biljaka, kao što su zaštita od virusa i odgovor na stres kao što su ekstremne temperature i patogeni (Bariola i sar. 1994, Luhtala i Parker 2010). Takođe, učestvuju u procesima razvića kao što su formiranje i klijanje semena tokom embriogeneze, razviće korenova, ploda i cvetova i senescencija listova (Bariola i sar. 1994). *CeRNS3* sa maksimumom *FPKM* vrednosti u **ek** (*FPKM* =16,64, **Tabela 26.**, **Tabela 27.**) je aktivan tokom svih faza SE, međutim, ekspresija sličnog intenziteta je uočena i u uzorcima iz prirode, naročito cvetovima (**pnc** i **pzc**), kao i u svim tipovima korenova (**rk**, **kk**, **pck**, **Slika 38.**). Rezultati ukazuju da aktivnost ovog gena u kičici nije specifična za usko specijalizovani proces kao što je SE. Najviša ekspresija *CeRNS3* u cvetovima se može objasniti njegovim dokazanim ulogama tokom klijanja semena i razvića cveta (Barker i sar. 1974, Winchcombe i Bewley 1992, Bariola i sar. 1994), a aktivnost u svim uzorcima korenova je u skladu sa njegovom ulogom tokom ćelijske elongacije i diferencijacije (Trebal i sar. 1979, Bariola i sar. 1994).

Rezultati klaster analize prikazane u vidu toplotne mape potvrdili su postojanje zajedničkih obrazaca ekspresije gena koji su karakteristični za određena tkiva ili organe (**Slika 39**). Posebno se ističe grupa embriogenih tkiva koja je blisko povezana. Embriogeni kalus, kao zasebna grupa, deli sličnosti sa drugim embriogenim tkivima kao što su **gse** i **kse** i drugim tipom kalusa, **ok**, što ukazuje na verovatno postojanje zajedničkih regulatornih mreža koje rukovode ekspresijom gena tokom SE (**Slika 39.**).

5.5. Indukcija sekundarne i ciklične SE

Jedan od najvažnijih faktora u indukciji SE kod većine biljnih vrsta jeste koncentracija auksina i citokinina prisutnih u podlozi. Po pitanju zahteva za regulatorima rastenja radi indukcije sekundarne SE, Raemakers i sar. (1995) su zaključili da vrste pogodnih RRB za indukciju primarne SE takođe odgovaraju i za sekundarnu SE, što rezultati potvrđuju. Naime, 2,4-D i CPPU su uspešno indukovali kako primarnu (Filipović i sar. 2015), tako i sekundarnu SE kod *C. erythraea* (**Slika 40.**, **Slika 41.**, **Slika 42.**, **Slika 43.**). Slično tome, 2,4-D je indukovala i primarnu i sekundarnu SE kod kikirikija (Baker i Wetzstein 1995) i *Magnolia dealbata* (Chávez-Cortazar i sar. 2020), dok je kod nekih biljnih vrsta za efikasnu indukciju i primarne i sekundarne SE bila pogodna podloga bez RRB (Szewczyk-Taranek i Pawłowska 2015). Međutim, postoje slučajevi gde je primarna SE indukovana pomoću RRB, ali je za indukciju sekundarne SE neophodna podloga bez RRB. Na primer, kod karanfila je primarna SE indukovana primenom 2,4-D i CPPU, dok su sekundarni **se** indukovani na podlozi bez RRB (Aalifar i sar. 2019). Kombinacija 2,4-D i CPPU je istraživana tokom indukcije primarne SE (Fiore i sar. 2002, Zhang i sar. 2005, Fiuk i Rybczyński 2008, Filipović i sar. 2015), ali vrlo retko tokom indukcije sekundarne SE (Nakano i sar. 1997, Little i sar. 2000, Zhang i sar. 2005). Adventivni (sekundarni) embrioni su se formirali na podlogama koje sadrže 2,4-D i CPPU kod vinove loze (Nakano i sar. 1997) i *Epipremnum aureum* (Zhang i sar. 2015), međutim, ova kombinacija RRB nije indukovala sekundarne **se** kod kikirikija (Little i sar. 2000).

Još jedan važan faktor za efikasnost indukcije sekundarne SE je stadijum razvića primarnih embriona. Neki uspešni protokoli za indukciju sekundarne SE koristili su **kse** kao eksplantate, na primer kod *P. menziesii* (Lelu-Walter i sar. 2018) i *A. trifoliata* (Zou i sar. 2019). U nekim biljnim vrstama, **gse** su bili pogodniji za indukciju sekundarne SE u odnosu na **kse**. Međutim, efikasna indukcija sekundarne SE zabeležena je za sve razvojne stadijume somatskih embriona (srce, torpedo, kotiledonarni) kod kupusa, karfiola (Pavlović i sar. 2013) i *H. nobilis* (Szewczyk-Taranek i Pawłowska 2015). Listovi na kojima su dobijeni **kse** pokazali su veliki

potencijal za embriogenezu kod kičice, s obzirom na to da je sekundarna SE indukovana na svim testiranim podlogama (**Slika 43 b**).

Obrazac i učestalost sekundarne SE, kao i kalogeneze, na primarnim eksplantatima **kse** kičice zavisi od sastava podloge, gde su kombinacije 2,4-D i CPPU, kao i samo 2,4-D, korišćene kako bi se ispitala embriogena sposobnost primarnih **kse**. Formiranje kalusa je primećeno na svim podlogama, ali postojale su očigledne razlike u učestalosti i karakteristikama indukovanog kalusa u zavisnosti od kombinacija i koncentracija različitih RRB. Tokom primarne embriogeneze, povećanje koncentracija CPPU dovodi do indukcije **ek**, na primer, kod karanfila (Aalifar i sar. 2019). Međutim, koliko je do sada poznato, ne postoje podaci o efektu povećanja koncentracija CPPU na formiranje embriogenog kalusa tokom sekundarne SE.

U odsustvu RRB i na podlogama koje sadrže samo 2,4-D, somatski embrioni su se formirali isključivo direktno (**Slika 43 b**, **Slika 44 a**). Međutim, DSE je bila dominantna putanja razvića čak i na podlogama koje sadrže CPPU (uporediti grafike „samo **dkse**" i „samo **ikse**", **Slika 43 b**). Ovi rezultati su u saglasnosti sa literaturom, jer je kod gotovo svih biljnih vrsta poreklo embriona u sekundarnoj SE direktno, bez obzira na korišćene hormone. Direktna sekundarna embriogeneza indukovana je na podlogama bez RRB (Zou i sar. 2019), na podlogama sa različitim citokininima (Chen i Hong 2012) ili na podlogama sa 2,4-D (Karami i sar. 2009). Međutim, u ovom istraživanju, pored sekundarne DSE (**Slika 41 g**, **41 h** i **Slika 43 b**), uočena je i sekundarna ISE. Dva različita puta - DSE i ISE - na istom eksplantatu takođe su uočena tokom sekundarne SE u *Castanea sativa* (Corredoira i sar. 2016). Važnost tipa eksplantata i RRB u hranljivoj podlozi za indukciju SE kod kičice detaljno je razmotrena u revijskom pregledu Simonović i sar. (2020). Dok se u kulturi korenova SE manifestuje direktnim formiranjem na podlogama bez RRB (Subotić i sar. 2007), u kulturi listova se javlja ISE indukovana pomoću 2,4-D i CPPU (Filipović i sar. 2015). Trenutni rezultati ukazuju da je morfogenetski odgovor **kse** kičice kompleksan i da se može modulisati različitim kombinacijama regulatora rastenja. Po prvi put, kako je primećeno, i DSE i ISE su se javili na istom eksplantatu u *in vitro* kulturi kičice.

Iako su se **se** i **kse** formirali na svim testiranim podlogama, najveći broj **kse** po eksplantatu (**Tabela 28.**) i najveći broj eksplantata koji su formirali **se** ili **kse** (**Slika 43 b**) dobijen je na podlozi sa najvišom koncentracijom CPPU. Ovo zapažanje se slaže sa istraživanjem Chen i Hong (2012), koji su otkrili da povećanje koncentracije tiazurona, citokinina tipa uree, značajno povećava procenat indukovanja sekundarne SE u *Oncidium* sortama *Gower Ramsey* i *Sweet Sugar*. Nasuprot tome, Szewczyk-Taranek i Pawłowska (2015) su izvestili da je najveći broj **kse** po eksplantatu detektovan na podlozi bez RRB, dok je povećanje koncentracija citokinina smanjilo učestalost sekundarne SE. Citokinin CPPU je visoko aktivni derivat difeniluree sa izraženom efikasnošću u indukciji različitih morfogenetskih procesa, uključujući SE (Fiore i sar. 2002). Rezultati su pokazali da je niska efikasnost formiranja sekundarnih embriona na podlozi bez RRB ili na podlozi koja sadrži samo 2,4-D. U *Tetrapleura tetraptera* (Opabode i sar. 2011) i *M. dealbata* (Chávez-Cortazar i sar. 2020), sekundarni embrioni su formirani na podlogama koje su su bile obogaćene samo sa 2,4-D.

Histološka analiza je potvrdila da su se sekundarni embrioni formirali kako direktno (**Slika 42 d**, **42 e**, **42 f**), tako i indirektno (**Slika 42 g**, **42 h**, **42 i**) na primarnim **kse** eksplantatima kičice. Histološki pregled je pokazao da su DSE i ISE potekli iz subepidermalnih ćelija **kse** (**Slika 42 d**, **42 g**), što ukazuje na višećelijsko poreklo sekundarnih **se** kičice. Uopšteno, putanja i početak SE određeni su fiziološkim i morfološkim karakteristikama izvornog biljnog tkiva iz kojeg je eksplantat dobijen (Gaj 2004). Indukcija DSE je ograničena na somatske ćelije eksplantata koje su stekle embriogenu kompetenciju (Quiroz-Figueroa i sar. 2006). Prema (Puigderrajols i sar. 2001), formiranje **se** u hrastovoj kori zapravo započinje kada

počne dediferencijacija epidermalnih i subepidermalnih ćelija i čitava proliferacija meristema predstavlja PEM.

Na osnovu rezultata u pogledu strukture embriona može se zaključiti da su sekundarni **se** *C. erythraea* višećelijskog porekla. Pokazano je da se sekundarni embrioni kičice mogu razvijati iz ćelija PEM subepidermalnog sloja koje imaju sposobnost brze deobe. Takav odgovor može biti posledica različitog stepena ćelijske zrelosti eksplantata **kse** i različitog sadržaja endogenih hormona (Grzyb i sar. 2017). Kod *C. erythraea*, intenzivna deoba ćelija u subepidermalnim slojevima eksplantata **kse** i sposobnost brojnih susednih ćelija da deluju koordinisano, doveli su do diferencijacije i efikasnog razvića embriona. Pretpostavljeno je da to može biti glavni razlog za brzo formiranje sekundarnih **se** putem višećelijskog puta. Rezultati ukazuju da primarna i sekundarna SE kod kičice nastaju iz dve različite ontogenetske putanje, DSE i ISE. Ova dva procesa dovela su do formiranja **kse** i održavanja embriogene kompetencije tokom više od tri meseca. Sekundarni embrioni nastali su direktno iz primarnih **kse**, gde su neke epidermalne i/ili subepidermalne ćelije možda već bile embriogeno određene (Williams i Maheswaran 1986). Što se tiče sekundarne ISE, formiranje **se** iz **ek** sugeriše da su se ćelije kotiledona delile i proliferisale pre nego što su neke od ćelija kalusa postigle embriogenu kompetenciju, tako da se faza kalogeneze dogodila pre inicijacije embriogenog procesa.

Proces sekundarne embriogeneze kod kičice je asinhron (**Slika 41 e**, **41 h**), što je u skladu sa sekundarnom SE kod drugih vrsta (Karami i sar. 2009, You i sar. 2011). Asinhrono formiranje **se** kod kičice javlja i tokom DSE iz korenova (Subotić i sar. 2007) i tokom ISE iz listova (Filipović i sar. 2015). Sekundarni embrioni nastali su iz celokupne površine primarnih **kse** kičice (**Slika 41 c**, **41 e**, **Slika 42 a**, **42 b**, **42 c**). Kod drugih vrsta, sekundarni embrioni formiraju se iz različitih delova primarnih embriona, na primer, iz kotiledona (Karami i sar. 2009), hipokotila (Devi i Narmathabai 2011, Fernández Da Silva i sar. 2016), zone hipokotila/korena (Corredoira i sar. 2013), korenova (Nair i Dutta Gupta 2006), kombinacije ovih organa, na primer, iz kotiledona i radikula (Calic i sar. 2005) ili iz stominih ćelija zatvaračica (Chen i Hong 2012).

Indukcija sekundarne SE kod kičice na podlogama koje sadrže 0,5 mg^{-1} CPPU rezultirala je embrionima sa nepravilnom morfologijom (**Slika 44 c**, **44 d**). Nepravilnost u razviću embriona može biti posledica različitih uzroka, kao što su prekomerna upotreba RRB, dugotrajna izloženost ili akumulacija egzogenih auksina unutar tkiva (Garcia i sar. 2019). Sekundarni embrioni sa nepravilnom morfologijom mogu biti ponovo korišćeni za reindukciju kalusa, kako je predloženo od strane Ji i sar. (2017). Nepravilna morfologija sekundarnih embriona, sa druge strane, može uticati na njihovo klijanje i konverziju u klijance. Kako su izvestili Ji i sar. (2017), najbolju stopu konverzije imali su embrioni sa jednim i dva kotiledona (oko 60%), zatim embrioni sa više kotiledona i embrioni trubastog oblika. Zbog toga se embrioni sa nepravilnom morfologijom često odbacuju, iako neki od njih mogu ponovo biti iskorišćeni za indukciju ciklične SE. Odgovor na tretman hormonima može takođe zavisiti od oblika **kse**, i samo embrioni sa spojenim kotiledonima su uspešno indukovani ka produkciji **ek** prema Ji i sar. (2017). Sazrevanje i konverzija **se** u klijance su važni procesi koji omogućavaju uspostavljanje efikasnih sistema za regeneraciju (Mazri i sar. 2020). U ovom istraživanju, dobro razvijeni embrioni sa dva kotiledona su prevladavali na podlogama koje su sadržale 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU, i stoga su ovi embrioni prebačeni na podloge bez RRB radi klijanja i konverzije (**Slika 46 a**, **46 b**, **46 c**, **46 d**). Nakon pasažiranja, dobijene su zdrave biljke prirodne morfologije (**Slika 46 e**, **46 f**).

Sekundarna embriogeneza pruža mogućnost za poboljšanu produkciju somatskih embriona putem uspostavljanja ciklusa u kulturi, pa je stoga od velike važnosti utvrditi specifične uslove pod kojima se dešava ciklična SE (Mazri i sar. 2020). U ovom istraživanju ispitivani su efekti dve kombinacije 2,4-D i CPPU na embriogeni odgovor **kse** tokom nekoliko

ciklusa (**Slika 14.**, **Slika 45.**). Utvrđeno je da se embriogeni potencijal (produkcija **ek** i **se**) **kse** povećava sa napredovanjem ciklusa. Eksplantati **kse** su pokazali visoku stopu embriogene kalogeneze, koja se povećavala sa napredovanjem ciklusa na obe podloge (**Slika 45 a**, **45 b**), dok se produkcija **se** povećala u trećem ciklusu na nižoj koncentraciji (**Slika 45 c**), a gotovo svi eksplantati proizvodili su **se** na višoj koncentraciji tokom dva ciklusa (**Slika 45 d**). Literatura na temu cikličnе SE pokazuje da efikasnost cikличne embriogeneze varira među različitim vrstama. Kod *Musa acuminata* AAA cv. Grand Naine, potencijal eksplantata za produkciju **se** nije opadao sa brojem ciklusa (Remakanthan i sar. 2014). Embriogeni potencijal i prosečan broj embriona po eksplantatu postupno su se smanjivali tokom subkulture u *A. trifoliata* (Zou i sar. 2019). Slično tome, procenat eksplantata sa **se** se smanjivao sa svakim ciklusom indukcije SE kod *M. dealbata* (Chávez-Cortazar i sar. 2020) i kod dve sorte *Brassica oleracea* (Pavlović i sar. 2013). Kod *C. persicum*, na regenerativnu kompetenciju kalusa je uticao broj ciklusa subkulture, jer je kalus iz prvog ciklusa pokazao najveću kompetenciju za SE, koja se smanjila u drugom ciklusu (You i sar. 2011). Pires i sar. (2020) su razvili strategiju za oporavak i održavanje cikличne embriogeneze u embriogenom kalusu masline putem subkulture, što je povećalo prosečan broj **se** na kalusu. Stoga bi **ek** indukovan u sistemu cikличne SE kičice mogao biti ponovo korišćen prenosom na podlogu koja bi mogla poboljšati sazrevanje **ikse**.

U ovom istraživanju, broj eksplantata koji produkuju **kse** se smanjivao na obe vrste podloga tokom ciklusa (**Slika 45 c**, **45 d**). Odstupanje u broju eksplantata koji su formirali **se** bilo kog razvojnog stadijuma i broja eksplantata sa formiranim **se** u kotiledonarnom stadijumu znači da se embriogena sposobnost eksplantata nije smanjivala, već da se brzina sazrevanja embriona usporavala sa subkulturom. Smanjenje broja potpuno razvijenih **kse** koje je primećeno u cikličnoj SE kičice moglo bi predstavljati dokaz da dugotrajno održavanje na induktivnim podlogama utiče na sposobnost **se** da napreduju do kasnijih stadijuma. Dugotrajna izloženost auksinu 2,4-D može uticati na sazrevanje embriona, iako je ovaj auksin dokazano važan faktor u indukciji SE. Neka istraživanja su pokazala da prisustvo 2,4-D u podlozi pogoduje indukciji i proliferaciji **ek**, ali da smanjenje ili uklanjanje 2,4-D stimuliše razviće i sazrevanje **se** (Karami i sar. 2009, Ali i sar. 2017). Embriogeni kalus dobijen iz nezrelih zigotskih embriona bora mogao je proizvesti **se** (Gao i sar. 2021), ali stopa produkcije **se** je bila niska, a sazrevanje je ograničeno. Produženo gajenje na induktivnoj podlozi rezultiralo je povećanjem broja globularnih i srcastih embriona, ali nije stimulisalo formiranje zrelih embriona (Devi i Narmathabai 2011). Pored toga, **ek** može izgubiti potencijal za SE nakon produženog perioda subkulture na podlozi sa 2,4-D. Iako je u ovom istraživanju ciklična SE indukovana na obe kombinacije 2,4-D i CPPU, broj ciklusa je bio smanjen na većim koncentracijama 2,4-D i CPPU. Može se pretpostaviti da je izloženost **kse**, čak i niskoj koncentraciji 0,1 mgl^{-1} 2,4-D, tokom ciklusa poremetila ravnotežu endogenih regulatora rastenja u embriogenim eksplantatima i odložila sazrevanje novoformiranih **kse**.

Ekspresija *CeNA1* gena u embriogenom tkivu ne menja se značajnije kroz cikluse sekundarne SE na podlozi sa 0,2 mgl^{-1} 2,4-D i 0,5 mgl^{-1} CPPU (**Slika 47.**). Statistički značajan porast u ekspresiji *CeNA1* uočen prilikom tranzicije iz primarne u prvi ciklus sekundarne SE, verovatno je posledica promene sastava embriogenog tkiva. Naime, tkivo primarne SE karakteriše prisustvo embriona u različitim stadijumima (posebno **kse**), dok se sa napredovanjem kroz cikluse sekundarne SE postepeno smanjuje broj novoformiranih **kse**. Ovi rezultati potvrđuju da se *CeNA1* gen eksprimira pretežno u tkivima sa manjim udelom formiranih embriona (**Slika 36.**).

5.6. Uticaj genotipa na regenerativnu sposobnost embriogenog kalusa i ekspresija odabranih gena u embriogenom tkivu genotipova sa različitom regenerativnom sposobnošću

Indukcija kalusa je važan korak u kulturi tkiva, u kojem formirani organi prolaze kroz proces dediferencijacije i stiču potencijal za formiranje velikog broja novih biljaka. Ovaj proces ima izuzetan značaj za regeneraciju tkiva i organa, masovnu propagaciju i genetičko unapređenje biljaka (Mostafa i sar. 2020). Međutim, nisu sve ćelije unutar embriogenog kalusa totipotentne i ne poseduju sposobnost da se diferenciraju u somatske embrione, koji će na kraju formirati novu biljku (Long i sar. 2022). U okviru sistema regeneracije putem sekundarne SE u kičici, utvrđeno je da se sekundarna SE indukovana na koncentraciji 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU može održavati kroz tri ciklusa (poglavlje 4.5.5.). Ograničavajući faktor u ovom sistemu je broj formiranih **kse** na **ek** u primarnoj SE, koji se koriste kao početni eksplantati za pokretanje narednih ciklusa.

U cilju ispitivanja uticaja genotipa na regenerativnu sposobnost embriogenog kalusa, eksplantati listova 38 različitih genotipova gajeni su na MS podlozi sa 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU radi indukcije primarne SE (poglavlje 3.1.9.). Nakon četiri nedelje u kulturi, ustanovljeno je da, iako su svi eksplantati listova formirali **ek** (rezultati nisu prikazani), postoji značajna varijabilnost među genotipovima u broju formiranih **kse**, koji se kretao u rasponu 1 do 30 **kse** po eksplantatu (**Slika 48.**, **Slika 49.**).

Prethodna istraživanja ukazuju na to da genotip ima značajan uticaj na proces SE kod biljaka. Na primer, McKently (1995) je zaključio da različiti genotipovi kikirikija pokazuju značajne razlike u formiranju somatskih embriona i regeneraciji biljaka. Mozsar i Viczian (1996) su zabeležili znatne varijacije među sortama vinove loze u odgovoru na SE i klijanje embriona. Chen i sar. (1987) su otkrili razlike među genotipovima lucerke u sposobnosti formiranja somatskih embriona i biljaka iz kultura kalusa. Bailey i sar. (1993) su pronašli da se genotipovi soje razlikuju u indukciji i održavanju embriogenih kultura, kao i u prinosu embriona u kotiledonarnoj fazi i stopi konverzije u biljke.

Rezultati su potvrdili da genotip ima važnu ulogu u diferencijaciji kalusa kod kičice (**Slika 48.**, **Slika 49.**). Razlike u regenerativnoj sposobnosti **ek** mogu proizilaziti iz više faktora. Jedan od njih je endogena koncentracija hormona u tkivu eksplantata, koja može značajno uticati na morfogenetski odgovor. Naime, visoki nivoi endogenih auksina i citokinina imaju važnu ulogu u inicijaciji centara proliferacije u eksplantatima (Valdés i sar. 2001) i pretežno regulišu procese deobe ćelija i diferencijaciju. Prema rezultatima istraživanja Pérez-Jiménez i sar. (2012), endogene razlike u sadržaju endogenih hormona među različitim varijetetima *Prunus persica* L. Batsch mogu dovesti do značajnih razlika u regeneraciji putem organogeneze. Iako je do sada razvijeno više protokola za regeneraciju kičice putem SE (Barešová i Kaminek 1984, Subotić i Grubišić 2007, Trifunović-Momčilov i sar. 2015), varijacije u endogenom sadržaju hormona u ovom procesu još uvek nisu ispitane.

Varijacije u regenerativnom odgovoru takođe mogu biti posledica različite osetljivosti tkiva na primenu regulatora rastenja. Pérez-Jiménez i sar. (2014) su zaključili da genotipovi koji formiraju masivniji kalus i ispoljavaju snažniji embriogeni odgovor verovatno potiču iz tkiva sa većom osetljivošću na RRB. Razlike u apsorpciji i metabolizmu RRB mogu dovesti do pojačanog ili smanjenog odgovora na regulatore rastenja, što naposletku dovodi do različitog regenerativnog odgovora. Ove razlike su direktno povezane sa genotipom, budući da se tkivo eksplantata sastoji od ćelija sa različitom sposobnošću za odgovor na induktivni tretman (Jiménez 2005). Na primer, kod vrsta koje su manje sklone regeneraciji, kao što su drvenaste biljke, često postoje genotipovi koji brže reaguju na određeni set induktivnih uslova od drugih

(Jiménez 2005). Naime, osetljivost tkiva na promene u koncentraciji hormona u pojedinim slučajevima može biti važnija od same koncentracije, što može dovesti do različite sposobnosti za diferencijaciju organa ili tkiva (Trewavas 1981). Uticaj genotipa na regenerativnu sposobnost embriogenog kalusa kod kičice ukazuje na to da je genotip jedan od glavnih faktora koje treba uzeti u obzir tokom planiranja eksperimenata u kojima je važan broj dobijenih **kse**, kao što je propagacija SE kroz cikluse.

Rezultati RT-qPCR analize odabranih gena iz transkriptoma kičice ukazuju da nisu samo genotipovi, već su i profili genske ekspresije povezani sa varijacijama u kapacitetu za diferencijaciju **ek** (**Slika 50.**). Na primer, ekspresija gena *CeNA1*, *CeDC2.15-like* i *CeSERK* u embriogenom tkivu statistički značajno opada u genotipovima sa većim brojem diferenciranih embriona (posebno **kse**). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim na višoj koncentraciji RRB gde je ekspresija ovih gena bila najniža u tkivu **kse** (**Slika 36.**, **Slika 38.**). Ekspresija *CeNA1* drastično opada sa porastom diferenciranosti embriogenog tkiva. Ovi rezultati dodatno potvrđuju predominantnu aktivnost *CeNA1* gena u manje diferenciranim tkivima. Sličan trend primećen je i kod *CeDC2.15-like* (**Slika 50.**), koji je prethodno identifikovan kao gen rane faze SE (**Slika 36.**). Zanimljivo je da ekspresija *CeTLP1* opada sa porastom diferencijacije tkiva (**Slika 50.**), iako je ovaj gen indukovan na višim koncentracijama RRB u svim fazama SE, a posebno u uzorku **kse** (**Slika 37.**). Ovo sugeriše da je ekspresija ovog gena osetljiva na koncentraciju egzogenih RRB, što regulaciju njegove aktivnosti u procesu SE čini još kompleksnijom.

Ekspresija odabranih genskih kandidata u velikoj meri odražava sastav embriogenog tkiva. Tokom četiri nedelje u kulturi embriogeno tkivo nekih genotipova dostiglo je veći stepen diferencijacije u poređenju sa drugima, te se struktura embriogenog tkiva razlikovala (**Slika 48.**). Tkiva koja su dostigla veći stepen diferencijacije imala su i veći broj formiranih **kse** na kalusu. Sa druge strane, tkiva genotipova sa nižom diferencijacijom su sadržala pretežno **ek**, sa manjim udelom embriona bilo kog stadijuma, a naročito **kse**.

Ekspresija gena u tkivu lista pre tretmana i četiri nedelje nakon indukcije, a sa uklonjenim novonastalim embriogenim tkivom, na podlozi sa 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU, često nije imala detektovane Ct vrednosti (**Prilog 1.**). Odsustvo detektovane ekspresije u netretiranom tkivu lista rozete nije iznenađujuće, s obzirom na to da su ciljni geni iz transkriptoma često pokazivali veoma niske vrednosti *FPKM* u **rl**, često van granica detekcije (**Tabela 27.**). Međutim, značajan broj uzoraka sa odsustvom očitane ekspresije u tkivu lista koje je preostalo nakon uklanjanja embriogenog tkiva ukazuje da dejstvo RRB na tkivo lista ne dovodi do značajnih promena u ekspresiji ovih gena u samom tkivu lista.

5.7. *In silico* analiza gena i proteina CeNA1

5.7.1. *In silico* analiza gena i promotora *CeNA1*

Mapiranjem transkripta TR23240|c0_g1_i1 na genom *C. erythraea* identifikovano je ukupno 11 genskih sekvenci koje su povezane sa *CeNA1* (**Tabela 30.**). Ove sekvence locirane su na istom kontigu, što sugeriše da se ovi geni nalaze u neposrednoj blizini u genomu. Tandemski duplirani geni su česti u genomima biljaka i predstavljaju do 16 % gena u *A. thaliana* (Rizzon i sar. 2006). Ovakvi genski klasteri verovatno nastaju kroz uzastopne duplikacije pojedinačnih gena. Nakon duplikacije, nove kopije gena mogu biti podložne promenama koje omogućavaju njihovu funkcionalnu divergenciju, što predstavlja važan mehanizam selektivne evolutivne prednosti kod biljaka (Flagel i Wendel 2009). Međutim, duplikacija gena često stvara kopije koje gube funkciju i postaju pseudogeni. Kao rezultat toga, od brojnih homologih

sekvenci koje koegzistiraju u genomu, samo je deo funkcionalnih gena. Od 11 *C. erythraea CeNA1* sekvenci, sedam ima očuvan ORF i visok nivo međusobne sličnosti (≥ 71,07%, **Slika 58.**, **Slika 59.**). Međutim, nukleotidne sekvence Fungi_00002820 i Fungi_00002833 nemaju predviđen ORF, što ukazuje na mogućnost da se radi o pseudogenima. Nasuprot tome, druge dve sekvence bez predviđenog ORF-a, Fungi_00002825 i Fungi_00002821, pokazuju visok stepen međusobne sličnosti (98,72% nukleotidne sličnosti, **Slika 58.**) i izuzetno su kratke (468 bp, **Tabela 30.**). To ukazuje da bi ove sekvence pre mogle biti rezultat artefakata sekvenciranja nego stvarni pseudogeni.

Familija gena se obično definiše kao grupa gena čiji članovi dele više od 50% sličnosti u sekvencama aminokiselina (Thornton i DeSalle 2000). Visoka homologija među CeNA1 aminokiselinskim sekvencama koje sadrže predviđene ORF-ove (≥ 80,2 %, **Slika 64.**), sugeriše da geni *CeNA1* verovatno čine istu gensku familiju. U okviru familije *CeNA1* gena nije uočena visoka divergencija sekvenci. Geni dele sličnu organizaciju egzona i introna, obično sa dva egzona razdvojena jednim intronom. Osim toga, pozicije i dužine prvih egzona su uglavnom slične kod svih homologa, dok pozicija drugog egzona varira kao posledica različitih dužina introna (**Slika 59.**). Struktura gena ukazuje na moguću visoku konzerviranost ovih gena tokom evolucije i zajedničke biološke funkcije. Takođe, postoji mogućnost da ovi geni prolaze kroz snažnu sinhronizovanu evoluciju koja dupliranim genima unutar iste familije omogućava da evoluiraju zajedno (Feliner i Rosselló 2012). Tokom sinhronizovane evolucije geni unutar multigenske familije zadržavaju slične ili identične sekvence, što može dovesti do zadržavanja sličnih funkcionalnih karakteristika između različitih članova familije (Feliner i Rosselló 2012). Fizička blizina tandemski dupliranih gena olakšava konverziju gena ili događaje neravnomernog prelaska koji mogu dovesti do sinhronizovane evolucije (Schenk i sar. 2009). Filogenetsko stablo prikazano na **Slici 63.**, na kome je primetan visok stepen proteinske homologije, ukazuje na verovatnu sinhronizovanu evoluciju unutar *CeNA1* familije u *C. erythraea*. Međutim, nije isključeno da su ovih sedam veoma sličnih sekvenci proistekle iz nedavnih događaja duplikacije gena.

Prilikom anotacije transkripta *CeNA1* TR23240|c0_g1_i1, nisu identifikovani homolozi u bilo kojim korišćenim anotacijama iz *SwissProt*, *nt*, *Pfam* i *GO* baza podataka (**Tabela 25.**). Upotrebljeni softver za anotaciju genoma kičice, *MAKER-P* (verzija *MAKER* softvera prilagođena za biljke), takođe omogućava funkcionalnu anotaciju gena, što podrazumeva prepoznavanje potencijalnih funkcija gena, proteinskih domena itd. (Campbell i sar. 2014). *MAKER-P* koristi *NCBI BLAST* i *UniProt/SwissProt* setove proteina kako bi dodelio pretpostavljene funkcije novim anotiranim genima. Uprkos ovim ažuriranim genomskim podacima, nije bilo moguće dobiti smislene informacije o genima *CeNA1*, s obzirom na to da pronađene anotacije ne potiču od biljnih organizama i ne mogu se interpretirati u biološkom kontekstu (**Tabela 32.**).

Regioni promotora genskih homologa *CeNA1* analizirani su pomoću alata *Binding Site Prediction* sa *PlantRegMap* koji koristi visokokvalitetne motive TF kako bi skenirao ulazne promotorske sekvence pomoću programa *MATCH* (Kel i sar. 2003). Rezultati ove analize pružaju detaljne informacije o vezivnim mestima za TF, uključujući informacije o porodici TF-a, komplementarnoj sekvenci i njenoj poziciji na promotoru, kao i značajnost podudaranja motiva. Osim toga, alat omogućava preuzimanje rezultata u standardizovanom formatu radi dalje analize (Kulkarni i Vandepoele 2020).

Transkripcioni faktori imaju značajne uloge tokom procesa razvića tako što interaguju sa drugim genima i regulišu njihovu aktivnost u sklopu kompleksnih genskih regulatornih mreža. Osim toga, evolucija ovih TF čvrsto je povezana s evolucijom mehanizama razvića (Kofuji i sar. 2003). Analiza transkriptoma tkiva koja su povezana sa SE ukazuje na prisustvo grupa gena koji kodiraju za TF iz MADS, AP2/ERF, bHLH, MYB, HB, WRKY, C2H2 i NAC i familija, i koji su povezani sa indukcijom SE u različitim biljnim vrstama (Thibaud-Nissen i sar. 2003,

Che i sar. 2006, Hosp i sar. 2007, Sharma i sar. 2008, Gliwicka i sar. 2013, Wickramasuriya i Dunwell 2015). Za promotore *CeNA1* gena mogu se vezati TF koji pripadaju većini navedenih familija (**Tabela 33.**, **Slika 61.**). Zapažena je značajna varijabilnost u broju motiva na promotorima za koje se mogu vezati TF, krećući se od 1 do 113 (**Tabela 33.**). Ova varijabilnost je u najvećoj meri posledica strukture promotorske sekvence gena Fungi_00002830 u kojoj su zastupljeni dugački tandemski ponovci kao što su CTCTCTCTCTCTCTCTCTG, TGTGTCAGAGAGAGAGAGAGA i slično. Da li je ova pojava rezultat artefakta sastavljanja genoma ili je stvarno tako, trenutno nije moguće sa sigurnošću tvrditi.

Članovi familija TF koji regulišu gene povezane sa SE pripadaju različitim funkcionalnim grupama, a među njima su često najčešći oni koji regulišu odgovore na hormone i stres, kao i oni koji kontrolišu procese razvića, pretežno razviće embriona i cveta (Thibaud-Nissen i sar. 2003, Che i sar. 2006, Hosp i sar. 2007, Sharma i sar. 2008, Gliwicka i sar. 2013, Wickramasuriya i Dunwell 2015). Najzastupljeniji *GO* termini koji bliže objašnjavaju moguće procese koje regulišu TF u promotorima gena *CeNA1* odnose se na regulaciju procesa razvića, odgovore na različite RRB, kao što su etilen i giberelin, kao i odgovore na abiotički i biotički stres (**Slika 62.**). Osim toga, za promotore svih gena, izuzev Fungi_00002829, primećeno je vezivanje TF koji učestvuju u razviću cveta i održavanju identiteta meristema cvasti (**Slika 62.**). Zanimljivo je da su geni za TF koji kontrolišu razviće biljnih reproduktivnih organa posebno česti među genima koji su aktivni tokom SE (Thibaud-Nissen i sar. 2003, Sharma i sar. 2008, Gliwicka i sar. 2013). Ovaj rezultat je u skladu sa aktivnošću *CeNA1* tokom različitih faza razvića kada je uočeno da ekspresija ovog gena nije zanemarljiva u cvetovima iz prirode (**pzc** i **pnc**, **Slika 36.**), što ukazuje na postojanje sličnosti u genetičkoj regulaciji mehanizama koji dovode do reproduktivne i embriogene tranzicije. Naposletku, još jedna od indikacija da su TF *CeNA1* gena povezani sa indukcijom SE dolazi iz činjenice da se među *GO* terminima za MIKC MADS TF koji se vezuju za promotore Fungi_00002822, Fungi_00002826 i Fungi_00002830, nalazi pojam „indukcija SE" (**Tabela 34.**).

5.7.2. *In silico* analiza proteina CeNA1

Predikcija tranzitnog peptida softverima *Target P2*, *Cello*, *DeepLoc* i *LA* ukazuje da bi CeNA1 proteini mogli biti ekstracelularni (**Tabela 36.**). Ekstracelularni proteini učestvuju u procesu SE tako što utiču na signalizaciju, adheziju ćelija, formiranje ekstracelularnog matriksa, transport hranljivih materija, regulaciju hormona i strukturne promene. Do sada je opisano više ekstracelularnih proteina koji su okarakterisani kao markeri SE, kao što su AGP, germini i germinu slični proteini (engl. „*Germin-like proteins*", GLPs) i nespecifični proteini lipidnog transfera (engl. „*Lipid transfer proteins*", LTPs) (de Jong i sar. 1993, Egertsdotter i von Arnold 1995, McCabe i sar. 1997, Schmidt i sar. 1997, Domon i sar. 2000, Alexandrova i Conger 2002, Chugh i Khurana 2002, Charbit i sar. 2004).

Na osnovu pojačane aktivnosti *CeNA1* u fazi indukcije **ek** tokom koje se dešava dediferencijacija i intezivna proliferacija ćelija (**Slika 36.**), moguće je da on deluje kao signalni molekul ili u procesima modifikacija ćelijskog zida. Signalni molekuli mogu pokrenuti posebne ćelijske procese poput deobe ćelija ili uticati na signalizaciju hormona koji su važni tokom SE (Yang i Zhang 2010). Osim toga, tokom SE se u ćelijama dešava preoblikovanje ćelijskog zida, gde ekstracelularni proteini omogućavaju ćelijama da prilagode svoj oblik i strukturu tokom obrazovanja embriona, na šta može ukazivati visok nivo ekspresije *CeNA1* koji se održava i tokom daljeg formiranja **se** (**Slika 36.**).

Korišćenjem *AlphaFold* servera prediktovani su potencijalni trodimenzionalni modeli strukture proteina CeNA1 (**Slika 66.**). *AlphaFold* implementira duboke neuronske mreže kako bi predvideo 3D konfiguraciju proteina, oslanjajući se na informacije iz aminokiselinske

sekvence (Jumper i sar. 2021, Tunyasuvunakool i sar. 2021). Kako bi se procenila pouzdanost predviđene prostorne strukture proteina, koristi se koncept intervala pouzdanosti, poznat kao pLDDT (engl. „*Predicted Local Distance Difference Test*“). Vrednosti pLDDT, koje se kreću od 0 do 100, izračunavaju se za svaku aminokiselinsku reziduu, a zatim se ove ak boje u rasponu od crvene (neuređena struktura) do tamno plave boje (pouzdana struktura), kako bi se vizualizovao stepen poverenja u prediktovanim modelima (Jumper i sar. 2021).

Osim kratkog strukturisanog dela u centru α-heliksa TR23240|c0_g1_i1 (označen plavom bojom na 3D modelu, 90 > pLDDT > 70, **Slika 66.**), kao i u modelima najbližih homologa Fungi_00002824 i Fungi_00002826 (modeli nisu prikazani zbog visoke sličnosti sa TR23240|c0_g1_i1), drugi delovi lanca proteina imaju manji stepen pouzdanosti predikcije. U predviđenom modelu drugog izabranog predstavnika grupe, Fungi_00002822, koji je takođe prisutan kod Fungi_00002827, Fungi_00002829 i Fungi_00002830 (rezultati nisu prikazani), intervali pouzdanosti su još niži (**Slika 66.**). U strukturi Fungi_00002828 zapažaju se uglavnom narandžasti i crveni regioni, što ukazuje na niske vrednosti pLDDT intervala (< 50). Kada su pLDDT vrednosti pretežno niske u *AlphaFold* predikciji, to označava manji stepen poverenja modela u tačnost predviđene strukture u većem delu proteina (Jumper i sar. 2021, Tunyasuvunakool i sar. 2021). Oblasti sa niskim stepenom poverenja u proteinima CeNA1 često se preklapaju sa regionima koji su inherentno neuređeni (engl. „*Intrinsically disordered regions*“, *IDRs*) i koji često imaju izgled trake (**Slika 66.**). Prema timu koji je razvio *AlphaFold*, ovakve regione sa prepoznatljivim izgledom trake ili pLDDT vrednostima ispod 50 ne bi trebalo smatrati definisanim strukturama, već kao predviđanjima neuređenosti (Jumper i sar. 2021). Neuređeni proteinski regioni se najčešće odlikuju visokom konformacionom heterogenošću koja je uslovljena njihovim aminokiselinskim sekvencama (Sterckx i sar. 2014, Das i sar. 2015, Holehouse i sar. 2017).

Iako postoji mogućnost da filtriranje regiona na osnovu pLDDT vrednosti ispod 50 može dovesti do prenaglašenog zaključivanja o neuređenosti, pLDDT vrednosti se smatraju konkurentnim prediktorom neuređenosti u poređenju sa drugim softverima koji se koriste kao standard u ovom kontekstu (Necci i sar. 2021). Ovo implicira da je većina oblasti sa izrazito niskim stepenom poverenja verovatno zaista inherentno neuređena umesto da se radi o dobro definisanim i pravilno savijenim trodimenzionalnim strukturama koje *AlphaFold* nije uspeo da predvidi. Niske pLDDT vrednosti dobijene modelovanjem CeNA1 proteina ne ukazuju nužno na potpuno netačnu predviđenu strukturu, niti na to da su proteini nefunkcionalni ili neupotrebljivi. Eksperimentalno je potvrđeno da značajan deo proteoma, posebno kod eukariotskih organizama, nema definisanu trodimenzionalnu strukturu. Na primer, strukturne anotacije ljudskog proteoma koje pruža *AlphaFold* otkrivaju veliki broj regiona sa niskim i veoma niskim stepenom poverenja koji se preklapaju sa *IDR* regionima (Ruff i Pappu 2021). U ovim proteinima, čitav lanac ili deo lanca ne zauzima savijenu strukturu u svojoj funkcionalnoj formi, već se pojavljuje kao fleksibilna i mobilna polipeptidna sekvenca (Dunker i Obradovic 2001, Tompa 2012, Uversky 2021). Analizom neuređenih proteina u genomu *A. thaliana* (Pietrosemoli i sar. 2013) utvrđeno je da su biološki procesi u koje su ovi proteini uključeni često povezani sa regulacijom ćelijskog ciklusa, signalizacijom, metabolizmom DNK i alternativnim splajsovanjem. Mnogi od ovih procesa su direktno vezani za detekciju i reakciju na spoljašnje stimuluse, kao što su percepcija svetlosti i odgovor na abiotički stres (Pietrosemoli i sar. 2013).

Poznato je da je indukcija SE jedan od načina na koji biljke reaguju na stresne uslove (Karami i sar. 2009, Zavattieri i sar. 2010, Fehér 2015, Tchorbadjieva 2016, Prudente i sar. 2020) koji proizilaze iz *in vitro* manipulacija, kao što su primena RRB, povrede, sterilizacija, neuravnoteženost mineralnih materija u sastavu hranljive podloge ili pasažiranje (Simonović i sar. 2020). Neuređenost u strukturi proteina CeNA1 ukazuje na to da su određeni delovi ovih

proteina verovatno podložni konformacionim promenama što bi moglo da im omogući da obavljaju svoje funkcije tokom razvića. U većini slučajeva funkcija neuređenih polipeptida je povezana sa privremenim vezivanjem za više (različitih) partnera sa visokom specifičnošću i niskim afinitetom. Ovakav način interakcije ne bi bio moguć putem „fiksnih" površina, već samo putem onih koje su sposobne da se prilagode se različitim konformacijama. U mnogim slučajevima *IDR* postaju strukturisani nakon vezivanja za partnera, a u nekim slučajevima isti protein može zauzeti različite strukture vezivanja u zavisnosti od partnera (Tompa 2005, Uversky 2021). Moguće objašnjenje zašto se procesi vezani za odgovor na spoljašnje stimuluse kod biljaka često povezuju sa velikim brojem neuređenih proteina je da su biljke razvile svestrane, kompleksne i fleksibilne sisteme za interakciju sa svojom okolinom, budući da kao sesilni organizmi nisu u mogućnosti da izbegnu promene i opasnosti u okolini, već se moraju prilagoditi putem svojih reakcija (Pietrosemoli i sar. 2013). Neuređenost proteina može predstavljati mehanizam za povećanje „povezanosti" molekularnih mreža nekog sistema, a kao posledica toga, takav sistem postaje sve kompleksniji i sofisticiraniji.

Međutim, prilikom tumačenja neuređenih struktura, najvažnije je uzeti u obzir sve aspekte istraživanja, s obzirom na to da konformaciona heterogenost u *AlphaFold* predviđanjima može poticati iz različitih aspekata korišćene metode (Jumper i sar. 2021). *AlphaFold* se oslanja na principe dubokog učenja i koristi informacije iz sličnih sekvenci kako bi predvideo strukturu proteina. Jedan od razloga koji bi mogao da dovede do smanjenja pouzdanosti predviđanja je činjenica da u u bazama podataka ne postoje sekvence slične CeNA1 proteinima (**Tabela 25.**),. Dodatno, jedan od glavnih parametara na kojima se zasniva *AlphaFold* modelovanje proizilazi iz korišćenja evolutivnih korelacija koje se izvode iz obimnih višestrukih poravnanja sekvenci (Shindyalov i sar. 1994, Marks i sar. 2011, Marks i sar. 2012, De Juan i sar. 2013, Hopf i sar. 2014, Hopf i sar. 2017). Za CeNA1 proteine nema potvrđenih homologa među biljnim vrstama, što može predstavljati izazov za precizno modelovanje ovakvih manje konzerviranih sekvenci. Zato je važno u budućim istraživanjima uključiti eksperimentalne metode koje bi pomogle u postizanju preciznijeg uvida u strukturu i funkcionalnost proteina CeNA1. Povezivanje eksperimentalnih podataka sa *AlphaFold* predviđanjima bi doprinelo stvaranju sveobuhvatne slike o CeNA1 proteinima i potvrdilo tačnost *in silico* predviđanja.

5.7.3. Transkript *CeNA1* - potencijalni član klase lncRNK molekula

Na osnovu sveobuhvatnih rezultata koji su prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji, postoje indikacije da marker najranije faze SE u kičici, transkript *CeNA1* (TR23240|c0_g1_i1), pripada klasi lncRNK molekula. Ova klasa ncRNK obuhvata transkripte duže od 200 nt sa niskim ili bez prisustva potencijala za kodiranje proteina, koji mogu nastati iz intergenskih, intronskih ili kodirajućih regiona gena u *sense* ili *antisense* orijentaciji (Chekanova 2015, Wang i Chekanova 2017, Budak i sar. 2020, Chen i sar. 2020).

Dugačke nekodirajuće RNK često imaju specifične funkcije u biološkim procesima, među kojima su kod biljaka najbolje istraženi epigentičko utišavanje tokom RNK usmerene DNK metilacije (engl. „*RNA-directed DNA methylation*", *RdDM*) i vernalizacije kojom se reguliše vreme cvetanja u nekim biljnim vrstama (Chekanova 2015). U procesu *RdDM*, koji je specifičan za biljke, različite lncRNK se vezuju za hromatin i na taj način omogućavaju formiranje kompleksa enzima za njegovu modifikaciju (Wang i Chekanova 2017). Gen *FLC* (engl. „*Flowering Locus C*") je glavni regulator vremena cvetanja u *A. thaliana*, i deluje kao represor koji inhibira cvetanje pri niskim temperaturama (Michaels i Amasino 1999). Istraživanja su pokazala da su barem dve vrste *lncRNA* prisutne na ovom lokusu na kojem se nalazi *FLC*. Grupa *lncRNA*, nazvanih *COOLAIR* (engl. „*Cold Induced Long Antisense Intragenic*

RNAs“), transkribuju se u *antisense* smeru u odnosu na *FLC* (Swiezewski i sar. 2009, Liu i sar. 2010, Sun i sar. 2013), dok je druga *lncRNA*, *COLDAIR* (engl. „*Cold Assisted Intronic Noncoding RNA*“), transkribovana iz introna gena *FLC* u *antisense* smeru (Heo i Sung 2011). Obe *lncRNA* učestvuju u regrutovanju kompleksa *PHD-PRC2*, što dovodi do epigenetičkog utišavanja *FLC* (Liu i sar. 2015). Osim u RdDM i vernalizaciji, lncRNK kod biljaka imaju uloge i u fotomorfogenezi (Jiao i sar. 2007), homeostazi fosfata (Liu i sar. 1997, Wasaki i sar. 2003, Franco-Zorrilla i sar. 2007, Jabnoune i sar. 2013), transportu neophodnih metabolita za rast ćelija u nesimbiotskim biljkama (Flemetakis i sar. 2000), razviću bočnih korenova (Bardou i sar. 2014), razviću koje kontroliše auksin (Ariel i sar. 2014), sintezi ćelijskog zida (Held i sar. 2008), lokalnoj biosintezi citokinina (Zubko i Meyer 2007) i tokom molekularne mimikrije (Chekanova 2015, Liu i sar. 2015).

Jedna od indikacija da bi *CeNA1* mogao biti *lncRNA* je njegova izrazito tkivno-specifična ekspresija koja ukazuje na dinamičnu regulaciju tokom SE, naročito tokom indukcije **ek** (**Slika 36.**). Ekspresija mnogih biljnih *lncRNA* regulisana je tokom razvića ili sredinskim uslovima. Na primer, mnoge *lncRNA* pokazuju značajne promene u ekspresiji u različitim tkivima, organima ili u odgovoru na biotički i abiotički stres (Liu i sar. 2012, Wang i Chekanova 2017, Chen i sar. 2020). Štaviše, *lncRNA* se obično eksprimiraju na način koji je specifičniji za tkiva u poređenju sa iRNK protein-kodirajućih gena. Metodom RT-qPCR je potvrđeno da je ekspresija čak 32% *lncRNA* u *A. thaliana* specifična za tip organa (Liu i sar. 2012). Ovakva visoka specifičnost ekspresije čini *lncRNA* potencijalno pogodnim markerima određenih tkiva i faza razvića (Chen i sar. 2020).

Istraživanje uloga regulatornih ncRNK u fazi indukcije embriogenog kalusa tokom ISE i indirektne organogeneze su u začetku, a do sada je za nekoliko klasa ncRNK potvrđeno da su povezane sa ovim procesima. Takođe, treba istaći da je na ovu temu objavljen ograničen broj nedavnih studija (Bravo-Vázquez i sar. 2023), što dodatno ukazuje na potrebu za daljim istraživanjima. Najveći napredak u razumevanju modulatorne uloge ncRNK u kalogenezi i dediferencijaciji ćelija ostvaren je kroz proučavanje miRNK, dok istraživanja siRNK i lncRNK predstavljaju novo i interesantno područje za dalja istraživanja. Ove miRNK, siRNK i lncRNK često pokazuju različite obrasce ekspresije tokom tranzicije od somatskih ćelija u ćelije kalusa i najčešće ostvaruju svoju funkciju interferišući sa različitim biološkim procesima, kao što su signalizacija i biosinteza hormona, odgovor na stres, rast, razviće i akumulacija lignina (Bravo-Vázquez i sar. 2023). Do sada je otkriveno da veliki broj miRNK ima ulogu u indukciji kalusa i dediferencijaciji tokom SE u mnogom biljnim vrstama kao što su *A. thaliana* (Liu i sar. 2016), kukuruz (*Zea mays* L.) (Shen i sar. 2013, Dinkova i Alejandri-Ramirez 2014, Alejandri-Ramírez i sar. 2018, Juárez-González i sar. 2019, López-Ruiz i sar. 2019), pšenica (*Triticum aestivum* L.) (Chu i sar. 2016), paradajz (*Solanum lycopersicum* L.) (Cao i sar. 2020), biljka čaja (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) (Gao i sar. 2019) i siRNK u kukuruzu (Ge i sar. 2017).

Zhang i sar. (2022) su u pirinču otkrili dva *lncRNA* transkripta koja su uključena u reprogramiranje ekspresije koje dovodi do dediferencijacije ćelija i proliferacije kalusa. Jedan od njih, OsCHELIN2084, pripada hromatinom obogaćenoj intergenskoj lncRNK (*che-lincRNA*), dok je OsCHENAT1709 duga nekodirajuća prirodna *antisense* RNK (*che-lncNAT*). Naime, ustanovljeno je da se ekspresija OsCHENAT1709 povećava u kalusu i smanjuje u diferenciranim tkivima. S druge strane, ekspresija OsCHELIN2084 je bila povećana u embrionima i slabo prisutna u kalusu. Analizom fenotipa mutiranih sojeva pirinča sa gubitkom funkcije OsCHENAT1709 (*chenat1709-T*) i *RNAi* mutanta (*chenat1709-RNAi*) pokazano je da je u embrionima mutanata *chenat1709-T* i *chenat1709-RNAi* došlo do inhibicije formiranja kalusa. Nasuprot tome, u *chelin2084-T*, mutantu sa gubitkom funkcije OsCHELIN2084, proliferacija kalusa je bila brža u poređenju sa divljim sojem. Osim toga, kalusi koji su transformisani *RNAi* vektorima OsCHELIN2084 pokazivali su brzu proliferaciju kalusa, a ćelije kalusa *chelin2084-T*

mutanta bile su kompaktne i sferične, što su karakteristike embriogenog kalusa. Autori pretpostavljaju da su ove lncRNK pozitivni regulatori ciljnih gena i da tako ostvaruju svoju ulogu, ali potrebna su dodatna istraživanja kako bi se razjasnio tačan mehanizam njihovog delovanja (Zhang i sar. 2022).

In silico predviđanjima zasnovanim na sekvenciranju RNK otkriveno je mnogo *lncRNA* čije obrasce ekspresije i funkcije tek treba potvrditi (Shuai i sar. 2014, Budak i sar. 2020). Međutim, iako se *RNA-seq* često koristi za identifikaciju *lncRNA*, nedostatak široke konzerviranosti *lncRNA* na nivou sekvence, uz visoko specifične obrasce ekspresije u tkivima, predstavlja izazove u *RNA-seq in silico* pristupu pri identifikaciji (Budak i sar. 2020). Metoda RT-qPCR omogućava detekciju i kvantifikaciju ekspresije u realnom vremenu i zbog toga se najčešće koristi za potvrdu ekspresije *lncRNA* koje su prethodno predviđene *in silico* (Shuai i sar. 2014). Transkript *CeNA1* TR23240|c0_g1_i1 pronađen pomoću *RNA-seq* nije pokazao homologiju sa poznatim kodirajućim sekvencama, proteinima ili proteinskim domenima, što ukazuje da je u pitanju sekvenca sa niskom konzerviranošću (**Tabela 25.**). Jedan od glavnih kriterijuma koji se primenjuje u mnogim postupcima identifikacije sekvenci *lncRNA* u transkriptomu podrazumeva upravo isključivanje kandidatskih transkripata koji pokazuju homologiju sa poznatim kodirajućim sekvencama, proteinima ili proteinskim domenima (Budak i sar. 2020).

Mnoge lncRNK dele slične karakteristike sa kanonskim iRNK, kao što su dužina > 200 nt, transkripcija pomoću RNK polimeraze II sa 5'-kapom i 3'- poli(A) repom i česta akumulacija u citoplazmi (van Heesch i sar. 2014). Bioinformatičke analize podataka otkrile su da značajan deo ovih transkripata može da sadrži *ORF*-ove (Ruiz-Orera i sar. 2014, Anderson i sar. 2015, Mackowiak i sar. 2015, Olexiouk i sar. 2016). Stoga, kada su povezani sa ribozomima, *ORF*-ovi ugrađeni u *lncRNA* imaju značajnu šansu da budu prevedeni u peptide. Međutim, peptidi koji potiču iz *lncRNA* imaju relativno kraći lanac (nazvani „mikropeptidi“, sa dužinom oko 100 ak) i slabiju konzerviranost među različitim vrstama, što je u skladu sa odlikama lncRNK, koje, za razliku od iRNK, često sadrže manji broj egzona i slabu filogenetsku konzerviranost (Cabili i sar. 2011, Derrien i sar. 2012, Kutter i sar. 2012, Necsulea i sar. 2014). *In silico* pristupom je ustanovljeno da sedam *CeNA1* sadrži intaktan *ORF*, ali sa malim brojem egzona (dva ili tri, **Slika 59.**). Ovi *ORF*-ovi pretpostavljeno kodiraju za klasu malih, ekstracelularnih proteina (100 do 194 ak, **Tabela 35.**, **Tabela 36.**), sa niskom konzerviranošću i niskom pouzdanošću predikcije 3D modela (**Slika 66.**). S obzirom na to, još uvek nije poznato koliko su ovi novootkriveni peptidi kodirani *ORF*-ovima iz *CeNA1* funkcionalni. Postojanje peptida ne znači uvek da on ima funkciju i potrebno je eksperimentalno dokazivanje njegovih bioloških uloga. Sa aspekta proteina koji pokreću evoluciju, smatra se da su ovi peptidi koji potiču iz *lncRNA* verovatno važan izvor novih proteina (Ruiz-Orera i sar. 2014). Iako to nije čest slučaj, neki mikropeptidi imaju specifične uloge u biološkim procesima (Hubé i Francastel 2018). Neki od tih mikropeptida koji su otkriveni u biljkama su ENOD 40 (engl. „*Early nodulin 40*“) iz soje, koji učestvuje u organogenezi nodula (Röhrig i sar. 2002), PLS (engl. „*POLARIS*“) i ROT4 (engl. „*ROTUNDIFOLIA*“) iz *A. thaliana* koji učestvuju u morfogenezi lista (Narita i sar. 2004, Chilley i sar. 2006), ROT18/ DLV1 iz *A. thaliana* koji učestvuje u organogenezi (Wen i sar. 2004) i KOD (engl. „*Kiss of death*“) iz kukuruza koji učestvuje u regulaciji programirane ćelijske smrti (Blanvillain i sar. 2011). S obzirom na navedeno, trebalo bi istražiti potencijalni biološki značaj sintetisanja mikropeptida CeNA1.

Dugačke nekodirajuće RNK mogu ostvarivati svoju funkciju na različite načine, delujući na transkripcionom, posttranskripcionom, translacionom i epigenetičkom nivou, a mogu uticati i na proteinsku lokalizaciju. Trenutno je rano donositi zaključke o tome da li *CeNA1* ostvaruje svoju ulogu tokom indukcije **ek** na nivou mikropeptida ili transkripta. U skladu sa

funkcionalnom raznolikošću, načini delovanja lncRNK takođe su vrlo raznoliki. LncRNK mogu regrutovati epigenetičke faktore da modifikuju stanje hromatina (Rinn i Chang 2012), formirati transkripcionu mašineriju kako bi pokrenule inicijaciju transkripcije (Bonasio i Shiekhattar 2014), ili delovati kao strukturni organizator koji učestvuje u formiranju organela (Naganuma i Hirose 2013). Pored toga, lncRNK se mogu komplementarno vezivati za druge klase RNK molekula kako bi modulisale ekspresiju gena na transkripcionom, posttranskripcionom i translacionom nivou, na primer kao moderator aktivnosti iRNK ili kao „mamac" za miRNK u procesu molekularne mimikrije (Poliseno i sar. 2010, Gong i Maquat 2011, Bonasio i Shiekhattar 2014, Tay i sar. 2014, Yoon i sar. 2014). Osim toga, lncRNK se mogu vezivati za proteine kako bi uticale na lokalizaciju ili aktivnost enzima (Wang i Chang 2011, Li i Liu 2019).

5.8. Buduće perspektive za funkcionalnu karakterizaciju *CeNA1* transkripta

Identifikacija i potvrda funkcije *CeNA1* je od suštinskog značaja za razumevanje molekularnih puteva koji se odvijaju tokom najranije faze SE kod kičice. Potencijalne funkcije *lncRNA* mogu se verifikovati putem konstrukcije transgenih linija sa smanjenom ili pojačanom ekspresijom gena (Radhamony i sar. 2005). *RNAi* je moćan alat funkcionalne genomike koji uzrokuje smanjenje nivoa ne samo RNK ciljnog gena, već i drugih blisko povezanih gena (McGinnis i sar. 2007). Na primer, Zhu i sar. (2014) su identifikovali *lncRNA* u *A. thaliana* koje su pokazivale diferencijalnu ekspresiju tokom infekcije sa *Fusarium oxysporum* i potvrdili antifungalnu aktivnost 10 intergenskih *lncRNA* koristeći *RNAi* mutantne linije.

Radi utišavanja ekspresije *CeNA1* konstruisana su dva *amiRNA* konstrukta u kojima je prirodna miRNK *A. thaliana* zamenjena sintetičkom *amiRNA* sekvencom dužine 21 nt, koja je visoko specifična za transkript TR23240|c0_g1_i1. Ove *amiRNA* sekvence su konstruisane u različitim regionima transkripta i sadrže planski introdukovane mismečeve na precizno definisanim mestima (**Slika 52.**). Ovi introdukovani mismečevi su važni, zbog toga što *amiRNA* sa savršenom komplementarnošću sa ciljnom sekvencom mogu pokrenuti tzv. „prelazno formiranje siRNK" (engl. „*Transitive siRNA formation*"), gde miRNK pokreće amplifikaciju sekvenci koje se nalaze blizu mesta njenog vezivanja. Te sekvence bi zatim same mogle dovesti do pokretanja utišavanja gena i na taj način uticati na druge neželjene gene (Vaucheret 2005).

Napravljeni *amiRNA* konstrukti su putem *Gateway* kloniranja ubačeni u ciljni vektor *pK7WG2D,1* koji poseduje dva promotora - *amiRNA* je deo kasete 35S promotora, dok se selektabilni marker GFP nalazi pod kasetom pROLD promotora (**Slika 57.**). Nakon provere, ovi ciljni vektori su su ubačeni u *A. tumefaciens* u cilju kompletiranja konstrukata za transformaciju kičice. Na transgenim biljkama sa utišanom ekspresijom *CeNA1* biće moguće pratiti efekat utišavanja *CeNA1* na različite parametre SE, kao i fenotip transgenih biljaka. Budući eksperimenti bi mogli pružiti dragocene informacije i bliže objasniti funkciju novog markera SE kod kičice detektovanog u ovoj doktorskoj tezi.

6. Zaključci

- Koristeći tehnologiju *NGS* sekvenciranja dobijen je transkriptom kičice u kome su objedinjeni transkripti poreklom iz embriogenih (**ek**, **gse**, **kse**) i vegetativnih tkiva (**rl**, **ek**, **aplh**). Ustanovljeno je da je transkriptom visokog kvaliteta i pokrivenosti, u kome je pronađeno 428 od 430 *BUSCO* gena. Podaci iz transkriptoma su dostupni javnosti i mogu se koristiti za selekciju gena od interesa tokom SE i organogeneze, kao i gena uključenih u sekundarni metabolizam kičice.
- Analizom ekspresije često korišćenih *housekeeping* gena čije su sekvence pronađene u transkriptomu, utvrđeno je da se geni *RPL2* i *TBP1* mogu koristiti kao adekvatni referentni geni za normalizaciju ekspresije gena u uzorcima tkiva i organa različitih razvojnih faza, uključujući SE, organogenezu i organe cvetalih biljaka iz prirode.
- Analizom ekspresije gena sa potencijalnom ulogom u SE u tkivima i organima različitih faza razvića, utvrđeno je da neki od njih aktivno učestvuju u ranoj ili kasnoj fazi SE. Posebno značajan je gen *CeNA1* koji pokazuje visoku ekspresiju u najranijoj fazi SE tokom formiranja embriogenog kalusa, kada dolazi do dediferencijacije i intezivne proliferacije ćelija. Na osnovu ovih rezultata, gen *CeNA1* se može predložiti kao marker rane faze somatske embriogeneze kod kičice.
- Sekundarna SE je prvi put prijavljena kod kičice. Ovaj sistem može obezbediti dugoročan izvor **ek** i **se** uspostavljanjem cikličnih kultura. Kompleksni morfogenetski odgovor **kse** kičice može biti modulisan različitim kombinacijama RRB. Ciklična SE dobijena u ovom istraživanju mogla bi se koristiti kod kičice kao metoda za dobijanje povećane količine embriogenih tkiva, a posebno **kse**, koji mogu klijati u zdrave biljke. Razvijeni sistem za sekundarnu i cikličnu SE takođe može imati fundamentalni značaj jer omogućava biohemijsku i molekularnu analizu **se** dobijenih iz korenova, listova i primarnih **kse** eksplantata kod kičice.
- Ekspresija *CeNA1* gena se povećava u embriogenom tkivu tokom tranzicije iz primarne ka prvom ciklusu sekundarne SE, a onda se ne menja značajnije.
- Evaluacijom broja **kse** koji se formiraju na **ek** indukovanom na eksplantatima listova različitih genotipova utvrđeno je da genotip ima uticaj na regenerativnu sposobnost **ek**. Ekspresija gena *CeNA1*, *CeTLP1-like, CeDC2.15-like* i *CeSERK* opada sa porastom diferenciranosti tkiva.
- *In silico* pristupom je ustanovljeno da u genomu kičice postoji 11 *CeNA1* gena, od kojih sedam poseduju kompletni ORF. Geni pretežno imaju dva egzona i jedan intron i pretpostavljeno kodiraju za male peptide sa neuređenim regionima. Na osnovu rezultata *in silico* analize gena i proteina CeNA1 postoje indikacije da transkript *CeNA1* TR23240|c0_g1_i1 pripada klasi lncRNK molekula.
- Konstruisani su vektori koji nose *amiRNA* konstrukte za utišavanje *CeNA1* gena. Vektori su ubačeni u soj *GV3101 A. tumefaciens* kojim će se u budućnosti genetički transfomisati kičica kako bi se detaljnije okarakterisala funkcija ovog gena tokom SE.

7. Literatura

Aalifar, M., Arab, M., Aliniaeifard, S., Dianati, S., Zare Mehrjerdi, M., Limpens, E., Serek, M. (2019) Embryogenesis efficiency and genetic stability of *Dianthus caryophyllus* embryos in response to different light spectra and plant growth regulators. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 139(3): 479-492.

Abe, T., Futsuhara, Y. (1986) Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics, 72: 3-10.

Abel, S., Nguyen, M. D., Chow, W., Theologis, A. (1995) ASC4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*: Structural characterization, expression in Escherichia coli, and expression characteristics in response to auxin. Journal of Biological Chemistry, 270(32): 19093-19099.

Abeles, F. B., Morgan, P., Saltveit, M. (1992) Ethylene in plant biology Academic press. San Diego.

Aleith, F., Richter, G. (1991) Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. Planta, 183(1): 17-24.

Alejandri-Ramírez, N. D., Chávez-Hernández, E. C., Contreras-Guerra, J. L., Reyes, J. L., Dinkova, T. D. (2018) Small RNA differential expression and regulation in Tuxpeño maize embryogenic callus induction and establishment. Plant Physiology and Biochemistry, 122: 78-89.

Alexandrova, K. S., Conger, B. (2002) Isolation of two somatic embryogenesis-related genes from orchardgrass (*Dactylis glomerata*). Plant Science, 162(2): 301-307.

Ali, M., Mujib, A., Tonk, D., Zafar, N. (2017) Plant regeneration through somatic embryogenesis and genome size analysis of *Coriandrum sativum* L. Protoplasma, 254(1): 343-352.

Almagro Armenteros, J. J., Sønderby, C. K., Sønderby, S. K., Nielsen, H., Winther, O. (2017) DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. Bioinformatics, 33(21): 3387-3395.

Amor, B. B., Wirth, S., Merchan, F., Laporte, P., d'Aubenton-Carafa, Y., Hirsch, J., Maizel, A., Mallory, A., Lucas, A., Deragon, J. M. (2009) Novel long non-protein coding RNAs involved in *Arabidopsis* differentiation and stress responses. Genome research, 19(1): 57-69.

Andersen, C. L., Jensen, J. L., Ørntoft, T. F. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-pcr data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Research, 64(15): 5245-5250.

Anderson, D. M., Anderson, K. M., Chang, C.-L., Makarewich, C. A., Nelson, B. R., McAnally, J. R., Kasaragod, P., Shelton, J. M., Liou, J., Bassel-Duby, R. (2015) A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. Cell, 160(4): 595-606.

Anderson, R., Clarke, A., Jermyn, M., Knox, R., Stone, B. (1977) A carbohydrate-binding arabinogalactan-protein from liquid suspension cultures of endosperm from *Lolium multiflorum*. Functional Plant Biology, 4(1): 143-158.

Ariel, F., Jegu, T., Latrasse, D., Romero-Barrios, N., Christ, A., Benhamed, M., Crespi, M. (2014) Noncoding transcription by alternative RNA polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. Molecular cell, 55(3): 383-396.

Armenteros, J. J. A., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., Von Heijne, G., Elofsson, A., Nielsen, H. (2019) Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. Life science alliance, 2(5).

Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., Sherlock, G. (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. Nature Genetics, 25(1): 25-29.

Auer, C., Frederick, R. (2009) Crop improvement using small RNAs: applications and predictive ecological risk assessments. Trends in biotechnology, 27(11): 644-651.

Bai, B., Su, Y. H., Yuan, J., Zhang, X. S. (2013) Induction of somatic embryos in *Arabidopsis* requires local YUCCA expression mediated by the down-regulation of ethylene biosynthesis. Molecular plant, 6(4): 1247-1260.

Bailey, M., Boerma, H., Parrott, W. (1993) Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 29: 102-108.

Baker, C. M., Wetzstein, H. Y. (1995) Repetitive somatic embryogenesis in peanut cotyledon cultures by continual exposure to 2,4-d. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 40(3): 249-254.

Balzan, S., Johal, G. S., Carraro, N. (2014) The role of auxin transporters in monocots development. Front Plant Sci, 5: 393.

Banjanac, T., Đurović, S., Jelić, M., Dragićević, M., Mišić, D., Skorić, M., Nestorović Živković, J., Šiler, B. (2019) Phenotypic and genetic variation of an interspecific *Centaurium* hybrid (Gentianaceae) and its parental species. Plants, 8(7): 224.

Banjanac, T., Siler, B., Skoric, M., Ghalawenji, N., Milutinovic, M., Bozic, D., Misic, D. (2014) Interspecific in vitro hybridization in genus *Centaurium* and identification of hybrids via flow cytometry, RAPD, and secondary metabolite profiles. Turkish Journal of Botany, 38(1): 68-79.

Bao, E., Jiang, T., Girke, T. (2014) AlignGraph: algorithm for secondary *de novo* genome assembly guided by closely related references. Bioinformatics, 30(12): i319-i328.

Bardou, F., Ariel, F., Simpson, C. G., Romero-Barrios, N., Laporte, P., Balzergue, S., Brown, J. W., Crespi, M. (2014) Long noncoding RNA modulates alternative splicing regulators in *Arabidopsis*. Developmental cell, 30(2): 166-176.

Barešová, H., Kaminek, M. (1984) Light induce embryogenesis in suspension culture of *Centaurium erythraea* Rafn. Plant tissue and cell culture propagation to crop improvement. Novák FJ, Havel L and Doleel J (eds.), Czech. Acad. Sci., Prague: 163-164.

Bargmann, B. O., Birnbaum, K. D. (2009) Positive fluorescent selection permits precise, rapid, and in-depth overexpression analysis in plant protoplasts. Plant Physiology, 149(3): 1231-1239.

Barh, D., Khan, M. S., Davies, E. (2015). PlantOmics: the omics of plant science, Springer.

Bariola, P. A., Howard, C. J., Taylor, C. B., Verburg, M. T., Jaglan, V. D., Green, P. J. (1994) The *Arabidopsis* ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. The Plant Journal, 6(5): 673-685.

Barker, G. R., Bray, C. M., Walter, T. J. (1974) The development of ribonuclease and acid phosphatase during germination of *Pisum arvense*. Biochemical Journal, 142(2): 211-219.

Bartels, D., Schneider, K., Terstappen, G., Piatkowski, D., Salamini, F. (1990) Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. Planta, 181: 27-34.

Baud, S., Kelemen, Z., Thévenin, J., Boulard, C., Blanchet, S., To, A., Payre, M., Berger, N., Effroy-Cuzzi, D., Franco-Zorrilla, J. M. (2016) Deciphering the molecular mechanisms underpinning the transcriptional control of gene expression by master transcriptional regulators in *Arabidopsis* seed. Plant Physiology, 171(2): 1099-1112.

Becker, D., Hedrich, R. (2002) Channelling auxin action: modulation of ion transport by indole-3-acetic acid. Plant Molecular Biology, 49: 349-356.

Benjamins, R., Scheres, B. (2008) Auxin: the looping star in plant development. Annu. Rev. Plant Biol., 59: 443-465.

Bennett, M. D., Smith, J. B. (1991) Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. Philosophical Transactions: Biological Sciences, 334(1271): 309-345.

Berkan, T., Üstünes, L., Lermioglu, F., Özer, A. (1991) Antiinflammatory, analgesic, and antipyretic effects of an aqueous extract of *Centaurium erythraea*. Planta medica, 57(01): 34-37.

Bhaskaran, M., Mohan, M. (2014) MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. Veterinary pathology, 51(4): 759-774.

Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., Bera, T., Bhatia, S., Bera, T. (2015). Somatic embryogenesis and organogenesis. Mod Appl Plant Biotechnol Pharm Sci, Academic press.

Blanvillain, R., Young, B., Cai, Y.-m., Hecht, V., Varoquaux, F., Delorme, V., Lancelin, J.-M., Delseny, M., Gallois, P. (2011) The *Arabidopsis* peptide kiss of death is an inducer of programmed cell death. The EMBO Journal, 30(6): 1173-1183.

Bogdanović, M., Cankar, K., Dragićević, M., Bouwmeester, H., Beekwilder, J., Simonović, A., Todorović, S. (2020) Silencing of germacrene A synthase genes reduces guaianolide oxalate content in *Cichorium intybus* L. GM Crops & Food, 11(1): 54-66.

Bogdanović, M. D. (2015) Биосинтеза гвајанолида код цикорије (*Cichorium intybus* L.)-утицај трансформације на продукцију и испитивање активности гермакрен А-синтазе и-оксидазе коришћењем промоторских фузија и утишавања гена.

Bogdanović, M. D., Dragićević, M. B., Tanić, N. T., Todorović, S. I., Mišić, D. M., Živković, S. T., Tissier, A., Simonović, A. D. (2013) Reverse transcription of 18S rRNA with Poly(dT)18 and other homopolymers. Plant Molecular Biology Reporter, 31(1): 55-63.

Bologna, N. G., Voinnet, O. (2014) The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. Annual review of plant biology, 65: 473-503.

Bonasio, R., Shiekhattar, R. (2014) Regulation of transcription by long noncoding RNAs. Annual review of genetics, 48: 433-455.

Bou Dagher-Kharrat, M., Abdel-Samad, N., Douaihy, B., Bourge, M., Fridlender, A., Siljak-Yakovlev, S., Brown, S. C. (2013) Nuclear DNA C-values for biodiversity screening: Case of the Lebanese flora. Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 147(4): 1228-1237.

Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V. K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C.-M., van Lammeren, A. A., Miki, B. L. (2002) Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. The Plant Cell, 14(8): 1737-1749.

Bouyahya, A., Belmehdi, O., El Jemli, M., Marmouzi, I., Bourais, I., Abrini, J., Faouzi, M. E. A., Dakka, N., Bakri, Y. (2019) Chemical variability of *Centaurium erythraea* essential oils at three developmental stages and investigation of their *in vitro* antioxidant, antidiabetic, dermatoprotective and antibacterial activities. Industrial Crops and Products, 132: 111-117.

Božunović, J., Živković, S., Gašić, U., Glamočlija, J., Ćirić, A., Matekalo, D., Šiler, B., Soković, M., Tešić, Ž., Mišić, D. (2018) *In vitro* and *in vivo* transformations of *Centaurium erythraea* secoiridoid glucosides alternate their antioxidant and antimicrobial capacity. Industrial crops and products, 111: 705-721.

Bravo-Vázquez, L. A., Angulo-Bejarano, P. I., Bandyopadhyay, A., Sharma, A., Paul, S. (2023) Regulatory roles of noncoding RNAs in callus induction and plant cell dedifferentiation. Plant Cell Reports, 42(4): 689-705.

Bravo, S., Bertín, A., Turner, A., Sepúlveda, F., Jopia, P., Parra, M. J., Castillo, R., Hasbún, R. (2017) Differences in DNA methylation, DNA structure and embryogenesis-related gene expression between embryogenic and non embryogenic lines of *Pinus radiata* D. don. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 130: 521-529.

Braybrook, S. A., Harada, J. J. (2008) LECs go crazy in embryo development. Trends in plant science, 13(12): 624-630.

Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O., Breitenbach, M. (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. The EMBO journal, 8(7): 1935-1938.

Brulle, F., Bernard, F., Vandenbulcke, F., Cuny, D., Dumez, S. (2014) Identification of suitable qPCR reference genes in leaves of *Brassica oleracea* under abiotic stresses. Ecotoxicology, 23(3): 459-471.

Budak, H., Kaya, S. B., Cagirici, H. B. (2020) Long non-coding RNA in plants in the era of reference sequences. Frontiers in Plant Science, 11: 276.

Cabili, M. N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., Rinn, J. L. (2011) Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. Genes & development, 25(18): 1915-1927.

Cabrera-Ponce, J. L., López, L., León-Ramírez, C. G., Jofre-Garfias, A. E., Verver-y-Vargas, A. (2015) Stress induced acquisition of somatic embryogenesis in common bean *Phaseolus vulgaris* L. Protoplasma, 252: 559-570.

Çabuk, B., Özgen, M. (2016) The effect of different 2, 4-D doses on callus induction and chromosomal structure in maize (Zea Mays L.). Infection, 2: 188-194.

Cairney, J., Pullman, G. S. (2007) The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. New phytologist, 176(3): 511-536.

Calic, D., Zdravkovic-Korac, S., Radojevic, L. (2005) Secondary embryogenesis in androgenic embryo cultures of *Aesculus hippocastanum* L. Biologia plantarum, 49(3): 435-438.

Campbell, M. S., Holt, C., Moore, B., Yandell, M. (2014) Genome annotation and curation using MAKER and MAKER-P. Current protocols in bioinformatics, 48(1): 4.11. 11-14.11. 39.

Cantarel, B. L., Korf, I., Robb, S. M., Parra, G., Ross, E., Moore, B., Holt, C., Sánchez Alvarado, A., Yandell, M. (2008) MAKER: an easy-to-use annotation pipeline designed for emerging model organism genomes. Genome Res, 18(1): 188-196.

Cao, H., Zhang, X., Ruan, Y., Zhang, L., Cui, Z., Li, X., Jia, B. (2020) miRNA expression profiling and zeatin dynamic changes in a new model system of *in vivo* indirect regeneration of tomato. PLOS ONE, 15(12): e0237690.

Cao, X., Zhang, F., Yuan, B., Meng, L., Yang, X., Jiang, J. (2017) *De novo* transcriptome sequencing and analysis of *Euphorbia pekinensis* Rupr. And identification of genes involved in diterpenoid biosynthesis. Plant Gene, 12: 33-42.

Carbonero, P., Iglesias-Fernández, R., Vicente-Carbajosa, J. (2017) The AFL subfamily of B3 transcription factors: evolution and function in angiosperm seeds. Journal of Experimental Botany, 68(4): 871-880.

Chakrabarty, D., Yu, K.-W., Paek, K. Y. (2003) Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleuterococcus senticosus*). Plant Science, 165(1): 61-68.

Chapman, A., Blervacq, A.-S., Vasseur, J., Hilbert, J.-L. (2000) Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of β-glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. Planta, 211: 305-314.

Charbit, E., Legavre, T., Lardet, L., Bourgeois, E., Ferrière, N., Carron, M.-P. (2004) Identification of differentially expressed cDNA sequences and histological characteristics of *Hevea brasiliensis* calli in relation to their embryogenic and regenerative capacities. Plant cell reports, 22: 539-548.

Chávez-Cortazar, A., Mata-Rosas, M., Oyama, K., Samain, M., Quesada, M. (2020) Induction of somatic embryogenesis and evaluation of genetic stability in regenerated plants of *Magnolia dealbata*. Biologia plantarum, 64(1).

Che, P., Lall, S., Nettleton, D., Howell, S. H. (2006) Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. Plant physiology, 141(2): 620-637.

Che, P., Love, T. M., Frame, B. R., Wang, K., Carriquiry, A. L., Howell, S. H. (2006) Gene expression patterns during somatic embryo development and germination in maize Hi II callus cultures. Plant Molecular Biology, 62: 1-14.

Chee, J., Chin, C. (2015) Gateway cloning technology: Advantages and drawbacks. Cloning Transgenes, 4: 138.

Chekanova, J. A. (2015) Long non-coding RNAs and their functions in plants. Current opinion in plant biology, 27: 207-216.

Chen, D., Ren, Y., Deng, Y., Zhao, J. (2010) Auxin polar transport is essential for the development of zygote and embryo in *Nicotiana tabacum* L. and correlated with ABP1 and PM H+-ATPase activities. Journal of experimental botany, 61(6): 1853-1867.

Chen, J.-T., Hong, P.-I. (2012) Cellular origin and development of secondary somatic embryos in Oncidium leaf cultures. Biologia plantarum, 56: 215-220.

Chen, L., Zhong, H.-y., Kuang, J.-f., Li, J.-g., Lu, W.-j., Chen, J.-y. (2011) Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. Planta, 234(2): 377-390.

Chen, L., Zhu, Q.-H., Kaufmann, K. (2020) Long non-coding RNAs in plants: Emerging modulators of gene activity in development and stress responses. Planta, 252: 1-14.

Chen, T. H. H., Marowitch, J., Thompson, B. G. (1987) Genotypic effects on somatic embryognesis and plant regeneration from callus cultures of alfalfa. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 8(1): 73-81.

Cheng, W.-H., Zhu, H.-G., Tian, W.-G., Zhu, S.-H., Xiong, X.-P., Sun, Y.-Q., Zhu, Q.-H., Sun, J. (2016) *De novo* transcriptome analysis reveals insights into dynamic homeostasis regulation of somatic embryogenesis in upland cotton (*G. hirsutum* L.). Plant Molecular Biology, 92(3): 279-292.

Chilley, P. M., Casson, S. A., Tarkowski, P., Hawkins, N., Wang, K. L.-C., Hussey, P. J., Beale, M., Ecker, J. R., Sandberg, G. K., Lindsey, K. (2006) The POLARIS peptide of *Arabidopsis* regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling. The Plant Cell, 18(11): 3058-3072.

Chimdessa, E. (2020) Composition and preparation of plant tissue culture medium. J. Tissue Cult. Bioengin, 3: 120.

Choi, D.-W., Song, J. Y., Kwon, Y. M., Kim, S.-G. (1996) Characterization of a cDNA encoding a proline-rich 14 kDa protein in developing cortical cells of the roots of bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings. Plant Molecular Biology, 30(5): 973-982.

Chu, Z., Chen, J., Xu, H., Dong, Z., Chen, F., Cui, D. (2016) Identification and Comparative Analysis of microRNA in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Callus derived from mature and immature embryos during *in vitro* culture. Frontiers in Plant Science, 7.

Chugh, A., Khurana, P. (2002) Gene expression during somatic embryogenesis–recent advances. Current Science: 715-730.

Colcombet, J., Boisson-Dernier, A., Ros-Palau, R., Vera, C. E., Schroeder, J. I. (2005) *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. The Plant Cell, 17(12): 3350-3361.

Conesa, A., Götz, S. (2008) Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. Int J Plant Genomics, 2008: 619832.

Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., Robles, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics, 21(18): 3674-3676.

Consortium, m., Roy, S., Ernst, J., Kharchenko, P. V., Kheradpour, P., Negre, N., Eaton, M. L., Landolin, J. M., Bristow, C. A., Ma, L. (2010) Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. Science, 330(6012): 1787-1797.

Consortium, T. U. (2022) UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. Nucleic Acids Research, 51(D1): D523-D531.

Corredoira, E., Cano, V., Bárány, I., Solís, M.-T., Rodríguez, H., Vieitez, A.-M., Risueño, M. C., Testillano, P. S. (2017) Initiation of leaf somatic embryogenesis involves high pectin esterification, auxin accumulation and DNA demethylation in *Quercus alba*. Journal of plant physiology, 213: 42-54.

Corredoira, E., San José, M. C., Vieitez, A. M., Allona, I., Aragoncillo, C., Ballester, A. (2016) *Agrobacterium*-mediated transformation of European chestnut somatic embryos with a *Castanea sativa* (Mill.) endochitinase gene. New Forests, 47(5): 669-684.

Corredoira, E., Valladares, S., Martínez, M. T., Vieitez, A. M., San José, M. C. (2013) Somatic embryogenesis in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Trees - Structure and Function, 27(6): 1597-1608.

Costa, F. F. (2005) Non-coding RNAs: New players in eukaryotic biology. Gene, 357(2): 83-94.

Coupe, S. A., Taylor, J. E., Isaac, P. G., Roberts, J. A. (1993) Identification and characterization of a proline-rich mRNA that accumulates during pod development in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Molecular Biology, 23: 1223-1232.

Cui, J., You, C., Chen, X. (2017) The evolution of microRNAs in plants. Current opinion in plant biology, 35: 61-67.

Das, R. K., Ruff, K. M., Pappu, R. V. (2015) Relating sequence encoded information to form and function of intrinsically disordered proteins. Current opinion in structural biology, 32: 102-112.

Datta, N., LaFayette, P. R., Kroner, P. A., Nagao, R. T., Key, J. L. (1993) Isolation and characterization of three families of auxin down-regulated cDNA clones. Plant molecular biology, 21: 859-869.

Davis, M. W., Jorgensen, E. M. (2022) ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. Front Bioinform, 2: 818619.

De-la-Peña, C., Nic-Can, G. I., Galaz-Ávalos, R. M., Avilez-Montalvo, R., Loyola-Vargas, V. M. (2015) The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. Frontiers in plant science, 6: 635.

de Jesús-Pires, C., Ferreira-Neto, J. R., Pacifico Bezerra-Neto, J., Kido, E. A., de Oliveira Silva, R. L., Pandolfi, V., Wanderley-Nogueira, A. C., Binneck, E., da Costa, A. F., Pio-Ribeiro, G. (2020) Plant thaumatin-like proteins: function, evolution and biotechnological applications. Current Protein and Peptide Science, 21(1): 36-51.

de Jong, A. J., Schmidt, E. D., de Vries, S. C. (1993) Early events in higher-plant embryogenesis. Plant molecular biology, 22: 367-377.

De Jong, F., Mathesius, U., Imin, N., Rolfe, B. G. (2007) A proteome study of the proliferation of cultured *Medicago truncatula* protoplasts. Proteomics, 7(5): 722-736.

De Juan, D., Pazos, F., Valencia, A. (2013) Emerging methods in protein co-evolution. Nature Reviews Genetics, 14(4): 249-261.

de Oliveira Santos, M., Romano, E., Yotoko, K. S. C., Tinoco, M. L. P., Dias, B. B. A., Aragao, F. J. L. (2005) Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis. Plant Science, 168(3): 723-729.

de Vega-Bartol, J. J., Santos, R. R., Simões, M., Miguel, C. M. (2013) Normalizing gene expression by quantitative PCR during somatic embryogenesis in two representative conifer species: *Pinus pinaster* and *Picea abies*. Plant Cell Reports, 32(5): 715-729.

Dean Rider Jr, S., Henderson, J. T., Jerome, R. E., Edenberg, H. J., Romero-Severson, J., Ogas, J. (2003) Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 35(1): 33-43.

Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D. G. (2012) The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. Genome research, 22(9): 1775-1789.

Devi, B. C., Narmathabai, V. (2011) Somatic embryogenesis in the medicinal legume *Desmodium motorium* (Houtt.) Merr. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 106(3): 409-418.

Dhar, U., Joshi, M. (2005) Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew.(Asteraceae): effect of explant type, age and plant growth regulators. Plant Cell Reports, 24: 195-200.

Dinkova, T. D., Alejandri-Ramirez, N. D. (2014). MicroRNA Expression and Regulation During Plant Somatic Embryogenesis. Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications: Transcriptional Regulation and Chromatin Remodelling in Plants. R. Alvarez-Venegas, C. De la Peña and J. A. Casas-Mollano. Cham, Springer International Publishing**:** 111-123.

Ditzer, A., Kirch, H.-H., Nair, A., Bartels, D. (2001) Molecular characterization of two alanine-rich Lea genes abundantly expressed in the resurrection plant *C. plantagineum* in response to osmotic stress and ABA. Journal of plant physiology, 158(5): 623-633.

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T. R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics, 29(1): 15-21.

Dodeman, V. L., Ducreux, G., Kreis, M. (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. Journal of Experimental Botany, 48(8): 1493-1509.

Dolezel, J. (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry Part A, 51: 127-128.

Domoki, M., Györgyey, J., Bíró, J., Pasternak, T., Zvara, A., Bottka, S., Puskás, L., Dudits, D., Fehér, A. (2006) Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf-protoplast-derived alfalfa cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 1759(11-12): 543-551.

Domon, J.-M., Neutelings, G., Roger, D., David, A., David, H. (2000) A basic chitinase-like protein secreted by embryogenic tissues of *Pinus caribaea* acts on arabinogalactan proteins extracted from the same cell lines. Journal of Plant Physiology, 156(1): 33-39.

Đorđević, M., Grdović, N., Mihailović, M., Jovanović, J. A., Uskoković, A., Rajić, J., Sinadinović, M., Tolić, A., Mišić, D., Šiler, B. (2019) *Centaurium erythraea* extract improves survival and functionality of pancreatic beta-cells in diabetes through multiple routes of action. Journal of ethnopharmacology, 242: 112043.

Duarte-Aké, F., Nic-Can, G., De-la-Peña, C. (2019) Somatic embryogenesis: Polycomb complexes control cell-to-embryo transition. Epigenetics in plants of agronomic importance: fundamentals and applications: transcriptional regulation and chromatin remodelling in plants: 339-354.

Dündar, F., Skrabanek, L., Zumbo, P. (2015) Introduction to differential gene expression analysis using RNA-seq. Applied Bioinformatics Core/Weill Cornell Medical College: 1-67.

Dunker, A. K., Obradovic, Z. (2001) The protein trinity—linking function and disorder. Nature biotechnology, 19(9): 805-806.

Eddy, S. R. (2011) Accelerated Profile HMM Searches. PLOS Computational Biology, 7(10): e1002195.

Egertsdotter, U., von Arnold, S. (1995) Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). Physiologia plantarum, 93(2): 334-345.

El Menyiy, N., Guaouguaou, F.-E., El Baaboua, A., El Omari, N., Taha, D., Salhi, N., Shariati, M. A., Aanniz, T., Benali, T., Zengin, G., El-Shazly, M., Chamkhi, I., Bouyahya, A. (2021)

Phytochemical properties, biological activities and medicinal use of *Centaurium erythraea* Rafn. Journal of Ethnopharmacology, 276: 114171.

El Meskaoui, A., Desjardins, Y., Tremblay, F. M. (2000) Kinetics of ethylene biosynthesis and its effects during maturation of white spruce somatic embryos. Physiologia Plantarum, 109(3): 333-342.

Engelmann, F. (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant, 47(1): 5-16.

Fattash, I., Khraiwesh, B., Arif, M. A. (2012) Expression of artificial MicroRNAs in *Physcomitrella patens*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 847: 293-315.

Fehér, A. (2015) Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 1849(4): 385-402.

Fehér, A. (2019) Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? Frontiers in plant science, 10: 536.

Feher, A., Pasternak, T. P., Dudits, D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant cell, tissue and organ culture, 74: 201-228.

Feliner, G. N., Rosselló, J. A. (2012). Concerted evolution of multigene families and homoeologous recombination. Plant Genome Diversity Volume 1: Plant Genomes, their Residents, and their Evolutionary Dynamics. J. F. Wendel, J. Greilhuber, J. Dolezel and I. J. Leitch. Vienna, Springer Vienna**:** 171-193.

Fernandes, H., Michalska, K., Sikorski, M., Jaskolski, M. (2013) Structural and functional aspects of PR-10 proteins. The FEBS journal, 280(5): 1169-1199.

Fernández Da Silva, R., Villarroel, A., Cuamo, L., Storaci, V. (2016) Evaluation of a somatic embryogenesis regenetation system for neem (*Azadirachta indica*). Acta Biologica Colombiana, 21(3): 581-592.

Filipović, B. K., Simonović, A. D., Trifunović, M. M., Dmitrović, S. S., Savić, J. M., Jevremović, S. B., Subotić, A. R. (2015) Plant regeneration in leaf culture of *Centaurium erythraea* Rafn. Part 1: The role of antioxidant enzymes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 121(3): 703-719.

Filipović, B. K., Trifunović-Momčilov, M. M., Simonović, A. D., Jevremović, S. B., Milošević, S. M., Subotić, A. R. (2021) Immunolocalization of some arabinogalactan protein epitopes during indirect somatic embryogenesis and shoot organogenesis in leaf culture of centaury (*Centaurium erythraea* Rafn). *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 57: 470-480.

Fincher, G. B., Stone, B. A., Clarke, A. E. (1983) Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. Annual Review of Plant Physiology, 34(1): 47-70.

Fiore, S., De Pasquale, F., Carimi, F., Sajeva, M. (2002) Effect of 2,4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of Citrus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 68(1): 57-63.

Fiuk, A., Rybczyński, J. J. (2008) Genotype and plant growth regulator-dependent response of somatic embryogenesis from *Gentiana* spp. leaf explants. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant, 44(2): 90-99.

Flagel, L. E., Wendel, J. F. (2009) Gene duplication and evolutionary novelty in plants. New Phytologist, 183(3): 557-564.

Flemetakis, E., Kavroulakis, N., Quaedvlieg, N. E., Spaink, H. P., Dimou, M., Roussis, A., Katinakis, P. (2000) *Lotus japonicus* contains two distinct ENOD40 genes that are expressed in symbiotic, nonsymbiotic, and embryonic tissues. Molecular plant-microbe interactions, 13(9): 987-994.

Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., García, J. A., Paz-Ares, J. (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. Nature genetics, 39(8): 1033-1037.

Fung, R. W., Gonzalo, M., Fekete, C., Kovacs, L. G., He, Y., Marsh, E., McIntyre, L. M., Schachtman, D. P., Qiu, W. (2008) Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. Plant physiology, 146(1): 236-249.

Gaj, M. D. (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regulation, 43(1): 27-47.

Gao, F., Peng, C., Wang, H., Shen, H., Yang, L. (2021) Selection of culture conditions for callus induction and proliferation by somatic embryogenesis of *Pinus koraiensis*. Journal of Forestry Research, 32: 483-491.

Gao, Y., Li, D., Zhang, L.-L., Borthakur, D., Li, Q.-S., Ye, J.-H., Zheng, X.-Q., Lu, J.-L. (2019) MicroRNAs and their targeted genes associated with phase changes of stem explants during tissue culture of tea plant. Scientific Reports, 9(1): 20239.

Garcia, C., Furtado de Almeida, A.-A., Costa, M., Britto, D., Valle, R., Royaert, S., Marelli, J.-P. (2019) Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2, 4-D: an overview. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 137: 193-212.

Ge, F., Huang, X., Hu, H., Zhang, Y., Li, Z., Zou, C., Peng, H., Li, L., Gao, S., Pan, G., Shen, Y. (2017) Endogenous small interfering RNAs associated with maize embryonic callus formation. PLOS ONE, 12(7): e0180567.

Gerdakaneh, M., Badakhshan, H., Mohamadi, M., Arji, I. (2020) Effect of different media and growth regulators on micropropagation of GF677. Plant Productions, 43(2): 241-254.

Giarola, V., Jung, N. U., Singh, A., Satpathy, P., Bartels, D. (2018) Analysis of pcC13-62 promoters predicts a link between cis-element variations and desiccation tolerance in Linderniaceae. Journal of Experimental Botany, 69(15): 3773-3784.

Giri, C. C., Shyamkumar, B., Anjaneyulu, C. (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. Trees, 18(2): 115-135.

Gliwicka, M., Nowak, K., Balazadeh, S., Mueller-Roeber, B., Gaj, M. D. (2013) Extensive modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Plos one, 8(7): e69261.

Glover, N. M., Redestig, H., Dessimoz, C. (2016) Homoeologs: what are they and how do we infer them? Trends in plant science, 21(7): 609-621.

Gomes, A. Q., Nolasco, S., Soares, H. (2013) Non-Coding RNAs: Multi-tasking molecules in the cell. International Journal of Molecular Sciences, 14(8): 16010-16039.

Gomez-Garay, A., Lopez, J. A., Camafeita, E., Bueno, M. A., Pintos, B. (2013) Proteomic perspective of *Quercus suber* somatic embryogenesis. Journal of proteomics, 93: 314-325.

Gonçalves, S., Cairney, J., Maroco, J., Oliveira, M. M., Miguel, C. (2005) Evaluation of control transcripts in real-time RT-PCR expression analysis during maritime pine embryogenesis. Planta, 222(3): 556-563.

Gong, C., Maquat, L. E. (2011) lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3′ UTRs via Alu elements. Nature, 470(7333): 284-288.

Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., Rokhsar, D. S. (2011) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. Nucleic Acids Research, 40(D1): D1178-D1186.

Gordon, D., Huddleston, J., Chaisson, M. J. P., Hill, C. M., Kronenberg, Z. N., Munson, K. M., Malig, M., Raja, A., Fiddes, I., Hillier, L. W., Dunn, C., Baker, C., Armstrong, J., Diekhans, M., Paten, B., Shendure, J., Wilson, R. K., Haussler, D., Chin, C.-S., Eichler, E. E. (2016) Long-read sequence assembly of the gorilla genome. Science, 352(6281): aae0344.

Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nature Biotechnology, 29(7): 644-652.

Grafi, G. (2004) How cells dedifferentiate: a lesson from plants. Developmental biology, 268(1): 1-6.

Grafi, G., Florentin, A., Ransbotyn, V., Morgenstern, Y. (2011) The stem cell state in plant development and in response to stress. Frontiers in plant science, 2: 53.

Grzyb, M., Kalandyk, A., Mikuła, A. (2017) Effect of TIBA, fluridone and salicylic acid on somatic embryogenesis and endogenous hormone and sugar contents in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. Acta Physiologiae Plantarum, 40(1): 1.

Guan, Y., Li, S.-G., Fan, X.-F., Su, Z.-H. (2016) Application of somatic embryogenesis in woody plants. Frontiers in Plant Science, 7(938).

Gulzar, B., Mujib, A., Malik, M. Q., Sayeed, R., Mamgain, J., Ejaz, B. (2020) Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 18: 1-15.

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(8): e71714.

Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., Henschel, R., LeDuc, R. D., Friedman, N., Regev, A. (2013) *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nature Protocols, 8(8): 1494-1512.

Haberlandt, G. (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber K Preuss Akad Wiss Wien. Math Naturwiss, 111: 69-92.

Hagen, G., Guilfoyle, T. (1985) Rapid induction of selective transcription by auxins. Molecular and cellular biology.

Hagen, G., Guilfoyle, T. (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. Plant molecular biology, 49: 373-385.

Hagen, G., Kleinschmidt, A., Guilfoyle, T. (1984) Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. Planta, 162: 147-153.

Hajheidari, M., Koncz, C., Bucher, M. (2019) Chromatin evolution-key innovations underpinning morphological complexity. Frontiers in Plant Science, 10: 454.

Hall T, A. (1999) BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp, 41: 95-98.

Hamza, N., Berke, B., Cheze, C., Agli, A.-N., Robinson, P., Gin, H., Moore, N. (2010) Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the C57BL/6J mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. Journal of ethnopharmacology, 128(2): 513-518.

Harding, E. W., Tang, W., Nichols, K. W., Fernandez, D. E., Perry, S. E. (2003) Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of *AGAMOUS-Like 15*. Plant Physiology, 133(2): 653-663.

Hartley, J. L. (2002) Use of the gateway system for protein expression in multiple hosts. Current Protocols in Protein Science, 30(1): 5.17. 11-15.17. 10.

Hatanaka, T., Sawabe, E., Azuma, T., Uchida, N., Yasuda, T. (1995) The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. Plant Science, 107(2): 199-204.

He, Y., Yan, H., Hua, W., Huang, Y., Wang, Z. (2016) Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR in *Gentiana macrophylla*. Frontiers in Plant Science, 7.

Hecht, V. r., Vielle-Calzada, J.-P., Hartog, M. V., Schmidt, E. D. L., Boutilier, K., Grossniklaus, U., de Vries, S. C. (2001) The *Arabidopsis* somatic embryogenesis Receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. Plant Physiology, 127(3): 803-816.

Heck, G. R., Perry, S. E., Nichols, K. W., Fernandez, D. E. (1995) AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. The Plant Cell, 7(8): 1271-1282.

Hedman, H., Zhu, T., von Arnold, S., Sohlberg, J. J. (2013) Analysis of the *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX* gene family in the conifer *Picea abies* reveals extensive conservation as well as dynamic patterns. BMC Plant Biology, 13: 1-10.

Held, M. A., Penning, B., Brandt, A. S., Kessans, S. A., Yong, W., Scofield, S. R., Carpita, N. C. (2008) Small-interfering RNAs from natural antisense transcripts derived from a cellulose synthase gene modulate cell wall biosynthesis in barley. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(51): 20534-20539.

Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome biology, 8(2): 1-14.

Heo, J. B., Sung, S. (2011) Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. Science, 331(6013): 76-79.

Hill, K., Schaller, G. E. (2013) Enhancing plant regeneration in tissue culture: a molecular approach through manipulation of cytokinin sensitivity. Plant signaling & behavior, 8(10): 212-224.

Hirt, H., Pay, A., Györgyey, J., Bako, L., Nemeth, K., Bögre, L., Schweyen, R. J., Heberle-Bors, E., Dudits, D. (1991) Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34cdc2. Proceedings of the National Academy of Sciences, 88(5): 1636-1640.

Hoang, N. V., Furtado, A., Mason, P. J., Marquardt, A., Kasirajan, L., Thirugnanasambandam, P. P., Botha, F. C., Henry, R. J. (2017) A survey of the complex transcriptome from the highly polyploid sugarcane genome using full-length isoform sequencing and *de novo* assembly from short read sequencing. BMC genomics, 18(1): 1-22.

Holehouse, A. S., Das, R. K., Ahad, J. N., Richardson, M. O., Pappu, R. V. (2017) CIDER: resources to analyze sequence-ensemble relationships of intrinsically disordered proteins. Biophysical journal, 112(1): 16-21.

Holk, A., Klumpp, L., Scherer, G. F. E. (2002) A cell wall protein down-regulated by auxin suppresses cell expansion in *Daucus carota* (L.). Plant Molecular Biology, 50(2): 295-305.

Hopf, T. A., Ingraham, J. B., Poelwijk, F. J., Schärfe, C. P., Springer, M., Sander, C., Marks, D. S. (2017) Mutation effects predicted from sequence co-variation. Nature biotechnology, 35(2): 128-135.

Hopf, T. A., Schärfe, C. P., Rodrigues, J. P., Green, A. G., Kohlbacher, O., Sander, C., Bonvin, A. M., Marks, D. S. (2014) Sequence co-evolution gives 3D contacts and structures of protein complexes. elife, 3: e03430.

Horstman, A., Bemer, M., Boutilier, K. (2017) A transcriptional view on somatic embryogenesis. Regeneration, 4(4): 201-216.

Hosp, J., de Maraschin, S. F., Touraev, A., Boutilier, K. (2007) Functional genomics of microspore embryogenesis. Euphytica, 158: 275-285.

Hotze, M., Waitz, A., Schröder, J. (1994) cDNA for a 14-kilodalton polypeptide from Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). Eight conserved cysteines in six related proteins from different plants suggest common functional elements. Plant physiology, 104(3): 1097.

Hrdlickova, R., Toloue, M., Tian, B. (2017) RNA-Seq methods for transcriptome analysis. Wiley Interdiscip Rev RNA, 8(1).

Hu, B., Jin, J., Guo, A.-Y., Zhang, H., Luo, J., Gao, G. (2015) GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. Bioinformatics, 31(8): 1296-1297.

Hu, H., Xiong, L., Yang, Y. (2005) Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. Planta, 222: 107-117.

Hu, R., Yu, C., Wang, X., Jia, C., Pei, S., He, K., He, G., Kong, Y., Zhou, G. (2017) *De novo* transcriptome analysis of *Miscanthus lutarioriparius* identifies candidate genes in rhizome development. Frontiers in plant science, 8: 492.

Hu, S., Zhang, M., Yang, Y., Xuan, W., Zou, Z., Arkorful, E., Chen, Y., Ma, Q., Jeyaraj, A., Chen, X., Li, X. (2020) A novel insight into nitrogen and auxin signaling in lateral root formation in tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. BMC Plant Biology, 20(1): 232.

Hubé, F., Francastel, C. (2018) Coding and non-coding RNAs, the frontier has never been so blurred. Frontiers in genetics, 9: 140.

Hung, Y.-H., Slotkin, R. K. (2021) The initiation of RNA interference (RNAi) in plants. Current Opinion in Plant Biology, 61: 102014.

Hutvágner, G., Zamore, P. D. (2002) RNAi: nature abhors a double-strand. Current opinion in genetics & development, 12(2): 225-232.

Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., Sugimoto, K. (2016) Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. Development, 143(9): 1442-1451.

Imin, N., Goffard, N., Nizamidin, M., Rolfe, B. G. (2008) Genome-wide transcriptional analysis of super-embryogenic *Medicago truncatula* explant cultures. BMC plant biology, 8: 1-14.

Imin, N., Nizamidin, M., Daniher, D., Nolan, K. E., Rose, R. J., Rolfe, B. G. (2005) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant Cultures Grown under 6-Benzylaminopurine and 1-Naphthaleneacetic Acid Treatments. Plant Physiology, 137(4): 1250-1260.

Inácio, V., Martins, M. T., Graça, J., Morais-Cecílio, L. (2018) Cork oak young and traumatic periderms show PCD typical chromatin patterns but different chromatin-modifying genes expression. Frontiers in Plant Science, 9: 1194.

Initiative, A. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408.

Iwase, A., Mita, K., Nonaka, S., Ikeuchi, M., Koizuka, C., Ohnuma, M., Ezura, H., Imamura, J., Sugimoto, K. (2015) *WIND1*-based acquisition of regeneration competency in *Arabidopsis* and rapeseed. Journal of plant research, 128: 389-397.

Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T., Inoue, Y., Seki, M., Sakakibara, H., Sugimoto, K. (2011) The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. Current Biology, 21(6): 508-514.

Jabnoune, M., Secco, D., Lecampion, C., Robaglia, C., Shu, Q., Poirier, Y. (2013) A rice cis-natural antisense RNA acts as a translational enhancer for its cognate mRNA and contributes to phosphate homeostasis and plant fitness. The Plant Cell, 25(10): 4166-4182.

Jain, M., Khurana, J. P. (2009) Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. The FEBS journal, 276(11): 3148-3162.

Jain, M., Tyson, J., Loose, M., Ip, C., Eccles, D., O'Grady, J., Malla, S., Leggett, R., Wallerman, O., Jansen, H., Zalunin, V., Birney, E., Brown, B., Snutch, T., Olsen, H., null, n. (2017) MinION analysis and reference consortium: Phase 2 data release and analysis of R9.0 chemistry. F1000Research, 6(760).

Jha, P., Kumar, V. (2018) BABY BOOM (BBM): a candidate transcription factor gene in plant biotechnology. Biotechnology letters, 40: 1467-1475.

Jha, P., Ochatt, S. J., Kumar, V. (2020) WUSCHEL: a master regulator in plant growth signaling. Plant cell reports, 39: 431-444.

Jha, U. C., Bhat, J. S., Patil, B. S., Hossain, F., Barh, D. (2015) Functional genomics: applications in plant science. PlantOmics: The omics of plant science: 65-111.

Ji, S. J., Lu, Y. C., Feng, J. X., Wei, G., Li, J., Shi, Y. H., Fu, Q., Liu, D., Luo, J. C., Zhu, Y. X. (2003) Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array. Nucleic acids research, 31(10): 2534-2543.

Ji, W., Luo, Y., Guo, R., Li, X., Zhou, Q., Ma, X., Wang, Y. (2017) Abnormal somatic embryo reduction and recycling in grapevine regeneration. Journal of Plant Growth Regulation, 36(4): 912-918.

Jiao, Y., Lau, O. S., Deng, X. W. (2007) Light-regulated transcriptional networks in higher plants. Nature Reviews Genetics, 8(3): 217-230.

Jiménez, J., López-Vela, D., Ruiz-Galea, M., Celestino, C., Toribio, M., Alegre, J. (2013) Embryogenic suspensions of adult cork oak: the first step towards mass propagation. Trees, 27(1): 13-23.

Jiménez, V. M. (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. Plant growth regulation, 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 (SE s) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. Plant Biotechnology Journal, 12(2): 161-173.

Jin, J., Liu, J., Wang, H., Wong, L., Chua, N.-H. (2013) PLncDB: plant long non-coding RNA database. Bioinformatics, 29(8): 1068-1071.

Jin, J., Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.-Q., Kong, L., Luo, J., Gao, G. (2016) PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. Nucleic Acids Research, 45(D1): D1040-D1045.

Jin, L., Yarra, R., Zhou, L., Zhao, Z., Cao, H. (2020) miRNAs as key regulators via targeting the phytohormone signaling pathways during somatic embryogenesis of plants. 3 Biotech, 10(11): 495.

Jo, Y., Lian, S., Cho, J. K., Choi, H., Chu, H., Cho, W. K. (2015) *De novo* transcriptome assembly of two different *Prunus salicina* cultivars. Genomics Data, 6: 262-263.

Johansen, D. A. (1940). Plant microtechnique.

Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., Bartel, B. (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. Annu. Rev. Plant Biol., 57: 19-53.

Joshi, S., Paul, P., Hartman, J. M., Perry, S. E. (2022) AGL15 Promotion of Somatic Embryogenesis: Role and Molecular Mechanism. Front Plant Sci, 13: 861556.

Jovanović, O., Radulović, N., Stojanović, G., Palić, R., Zlatković, B., Gudžić, B. (2009) Chemical composition of the essential oil of *Centaurium erythraea* Rafn. (Gentianaceae) from Serbia. Journal of Essential Oil Research, 21(4): 317-322.

Juárez-González, V. T., López-Ruiz, B. A., Baldrich, P., Luján-Soto, E., Meyers, B. C., Dinkova, T. D. (2019) The explant developmental stage profoundly impacts small RNA-mediated regulation at the dedifferentiation step of maize somatic embryogenesis. Scientific Reports, 9(1): 14511.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature, 596(7873): 583-589.

Jung, H., Winefield, C., Bombarely, A., Prentis, P., Waterhouse, P. (2019) Tools and Strategies for Long-Read Sequencing and *De Novo* Assembly of Plant Genomes. Trends in Plant Science, 24(8): 700-724.

Junker, A., Mönke, G., Rutten, T., Keilwagen, J., Seifert, M., Thi, T. M. N., Renou, J. P., Balzergue, S., Viehöver, P., Hähnel, U. (2012) Elongation-related functions of LEAFY COTYLEDON1 during the development of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 71(3): 427-442.

Kamphuis, L. G., Hane, J. K., Nelson, M. N., Gao, L., Atkins, C. A., Singh, K. B. (2015) Transcriptome sequencing of different narrow-leafed lupin tissue types provides a comprehensive uni-gene assembly and extensive gene-based molecular markers. Plant biotechnology journal, 13(1): 14-25.

Kanakachari, M., Solanke, A. U., Prabhakaran, N., Ahmad, I., Dhandapani, G., Jayabalan, N., Kumar, P. A. (2016) Evaluation of suitable reference genes for normalization of qPCR gene expression studies in Brinjal (*Solanum melongena* L.) During Fruit Developmental Stages. Applied Biochemistry and Biotechnology, 178(3): 433-450.

Karami, O., Aghavaisi, B., Mahmoudi Pour, A. (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. Journal of Chemical Biology, 2(4): 177-190.

Karim, R., Tan, Y. S., Singh, P., Nuruzzaman, M., Khalid, N., Harikrishna, J. A. (2018) Expression and DNA methylation of MET1, CMT3 and DRM2 during *in vitro* culture of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Philippine Agricultural Scientist, 101(3): 261-270.

Kasahara, H. (2015) Current aspects of auxin biosynthesis in plants. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 80: 1-9.

Katzen, F. (2007) Gateway(®) recombinational cloning: a biological operating system. Expert Opin Drug Discov, 2(4): 571-589.

Kel, A. E., Gossling, E., Reuter, I., Cheremushkin, E., Kel-Margoulis, O. V., Wingender, E. (2003) MATCHTM: a tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. Nucleic acids research, 31(13): 3576-3579.

Keller, B., Templeton, M. D., Lamb, C. J. (1989) Specific localization of a plant cell wall glycine-rich protein in protoxylem cells of the vascular system. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86(5): 1529-1533.

Kelley, L. A., Gardner, S. P., Sutcliffe, M. J. (1996) An automated approach for clustering an ensemble of NMR-derived protein structures into conformationally related subfamilies. Protein Eng, 9(11): 1063-1065.

Kępczyńska, E., Ruduś, I., Kępczyński, J. (2009) Endogenous ethylene in indirect somatic embryogenesis of *Medicago sativa* L. Plant growth regulation, 59: 63-73.

Kepczynski, J., McKERSIE, B. D., BROWN, D. C. (1992) Requirement of ethylene for growth of callus and somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L. Journal of experimental botany, 43(9): 1199-1202.

Kim, V. N. (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nature reviews Molecular cell biology, 6(5): 376-385.

Kirbağ, S., Zengin, F., Kursat, M. (2009) Antimicrobial activities of extracts of some plants. Pak. J. Bot, 41(4): 2067-2070.

Klemm, S. L., Shipony, Z., Greenleaf, W. J. (2019) Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. Nature Reviews Genetics, 20(4): 207-220.

Klimaszewska, K., Noceda, C., Pelletier, G., Label, P., Rodriguez, R., Lelu-Walter, M. A. (2008) Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.). *In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant, 45(1): 20.

Kofuji, R., Sumikawa, N., Yamasaki, M., Kondo, K., Ueda, K., Ito, M., Hasebe, M. (2003) Evolution and divergence of the MADS-box gene family based on genome-wide expression analyses. Molecular Biology and Evolution, 20(12): 1963-1977.

Kou, S. J., Wu, X. M., Liu, Z., Liu, Y. L., Xu, Q., Guo, W. W. (2012) Selection and validation of suitable reference genes for miRNA expression normalization by quantitative RT-PCR in citrus somatic embryogenic and adult tissues. Plant Cell Rep, 31(12): 2151-2163.

Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., Zažímalová, E. (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. Genome biology, 10(12): 1-11.

Kriventseva, E. V., Kuznetsov, D., Tegenfeldt, F., Manni, M., Dias, R., Simão, F. A., Zdobnov, E. M. (2018) OrthoDB v10: sampling the diversity of animal, plant, fungal, protist, bacterial and viral genomes for evolutionary and functional annotations of orthologs. Nucleic Acids Research, 47(D1): D807-D811.

Kukurba, K. R., Montgomery, S. B. (2015) RNA Sequencing and Analysis. Cold Spring Harb Protoc, 2015(11): 951-969.

Kulkarni, S. R., Vandepoele, K. (2020) Inference of plant gene regulatory networks using data-driven methods: A practical overview. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 1863(6): 194447.

Kumar, V., Van Staden, J. (2017) New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. Acta Physiologiae Plantarum, 39: 1-17.

Kutter, C., Watt, S., Stefflova, K., Wilson, M. D., Goncalves, A., Ponting, C. P., Odom, D. T., Marques, A. C. (2012) Rapid turnover of long noncoding RNAs and the evolution of gene expression. PLoS genetics, 8(7): e1002841.

Lam, J. K. W., Chow, M. Y. T., Zhang, Y., Leung, S. W. S. (2015) siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. Molecular Therapy - Nucleic Acids, 4.

Langmead, B., Salzberg, S. L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods, 9(4): 357-359.

Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J., Jürgens, G. (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. Development, 122(1): 87-96.

Lavy, M., Estelle, M. (2016) Mechanisms of auxin signaling. Development, 143(18): 3226-3229.

Law, C. W., Chen, Y., Shi, W., Smyth, G. K. (2014) voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. Genome biology, 15(2): 1-17.

Lebel, S., Schellenbaum, P., Walter, B., Maillot, P. (2010) Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family. BMC Plant Biology, 10(1): 184.

Lee, M., Jung, J. H., Han, D. Y., Seo, P. J., Park, W. J., Park, C. M. (2012) Activation of a flavin monooxygenase gene YUCCA7 enhances drought resistance in *Arabidopsis*. Planta, 235(5): 923-938.

Leggett, R. M., Clark, M. D. (2017) A world of opportunities with nanopore sequencing. Journal of Experimental Botany, 68(20): 5419-5429.

Leibfried, A., To, J. P., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J. J., Lohmann, J. U. (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. Nature, 438(7071): 1172-1175.

Lelu-Walter, M.-A., Gautier, F., Eliášová, K., Sanchez, L., Teyssier, C., Lomenech, A.-M., Le Metté, C., Hargreaves, C., Trontin, J.-F., Reeves, C. (2018) High gellan gum concentration and secondary somatic embryogenesis: two key factors to improve somatic embryo development in *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 132(1): 137-155.

Leyser, O. (2018) Auxin signaling. Plant physiology, 176(1): 465-479.

Li, B., Dewey, C. N. (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics, 12(1): 323.

Li, J., Liu, C. (2019) Coding or noncoding, the converging concepts of RNAs. Frontiers in Genetics, 10.

Li, L., Zhang, G., Wang, Q. (2016) *De novo* transcriptomic analysis of *Chlorella sorokiniana* reveals differential genes expression in photosynthetic carbon fixation and lipid production. BMC Microbiology, 16(1): 223.

Li, S.-B., Xie, Z.-Z., Hu, C.-G., Zhang, J.-Z. (2016) A review of auxin response factors (ARFs) in plants. Frontiers in plant science, 7: 47.

Li, T., Yuan, W., Qiu, S., Shi, J. (2021) Selection of reference genes for gene expression analysis in Liriodendron hybrids' somatic embryogenesis and germinative tissues. Sci Rep, 11(1): 4957.

Li, W., Masilamany, P., Kasha, K. J., Pauls, K. P. (2002) Developmental, tissue culture, and genotypic factors affecting plant regeneration from shoot apical meristems of germinated *Zea mays* L. seedlings. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 38: 285-292.

Lin, B., Hui, J., Mao, H. (2021) Nanopore technology and its applications in gene sequencing. Biosensors, 11(7): 214.

Lin, X., Hwang, G.-J. H., Zimmerman, J. L. (1996) Isolation and characterization of a diverse set of genes from carrot somatic embryos. Plant physiology, 112(3): 1365-1374.

Lin, Y. L., Lai, Z. X. (2010) Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree. Plant Science, 178(4): 359-365.

Liscum, E., Reed, J. W. (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. Plant Molecular Biology, 49(3): 387-400.

Little, E. L., Magbanua, Z. V., Parrott, W. A. (2000) A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. Plant Cell Reports, 19(4): 351-357.

Liu, C., Muchhal, U. S., Raghothama*, K. (1997) Differential expression of TPS11, a phosphate starvation-induced gene in tomato. Plant molecular biology, 33: 867-874.

Liu, D., He, X., Li, W., Chen, C., Ge, F. (2012) Molecular cloning of a thaumatin-like protein gene from *Pyrus pyrifolia* and overexpression of this gene in tobacco increased resistance to pathogenic fungi. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 111: 29-39.

Liu, D., Tu, L., Li, Y., Wang, L., Zhu, L., Zhang, X. (2008) Genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are specifically expressed during cotton fiber development. Plant Molecular Biology Reporter, 26: 98-113.

Liu, F., Marquardt, S., Lister, C., Swiezewski, S., Dean, C. (2010) Targeted 3′ processing of antisense transcripts triggers *Arabidopsis FLC* chromatin silencing. Science, 327(5961): 94-97.

Liu, J., He, Z. (2020) Small DNA methylation, big player in plant abiotic stress responses and memory. Frontiers in Plant Science, 11.

Liu, J., Jung, C., Xu, J., Wang, H., Deng, S., Bernad, L., Arenas-Huertero, C., Chua, N.-H. (2012) Genome-Wide Analysis Uncovers Regulation of Long Intergenic Noncoding RNAs in *Arabidopsis* The Plant Cell, 24(11): 4333-4345.

Liu, X., Hao, L., Li, D., Zhu, L., Hu, S. (2015) Long non-coding RNAs and their biological roles in plants. Genomics, proteomics & bioinformatics, 13(3): 137-147.

Liu, Z., Ge, X.-X., Qiu, W.-M., Long, J.-M., Jia, H.-H., Yang, W., Dutt, M., Wu, X.-M., Guo, W.-W. (2018) Overexpression of the *CsFUS3* gene encoding a B3 transcription factor promotes somatic embryogenesis in *Citrus*. Plant Science, 277: 121-131.

Liu, Z., Li, J., Wang, L., Li, Q., Lu, Q., Yu, Y., Li, S., Bai, M.-y., Hu, Y., Xiang, F. (2016) Repression of callus initiation by the miRNA-directed interaction of auxin-cytokinin in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 87(4): 391-402.

Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A., Carrington, J. C. (2002) Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. The Plant Cell, 14(7): 1605-1619.

Long, Y., Yang, Y., Pan, G., Shen, Y. (2022) New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms. Frontiers in Plant Science, 13.

López-Ruiz, B. A., Juárez-González, V. T., Luján-Soto, E., Dinkova, T. D. (2019) The role of small RNAs in plant somatic embryogenesis. Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications: Transcriptional Regulation and Chromatin Remodelling in Plants: 311-338.

López-Ruiz, B. A., Juárez-González, V. T., Sandoval-Zapotitla, E., Dinkova, T. D. (2019) Development-Related miRNA Expression and Target Regulation during staggered *in vitro* plant regeneration of Tuxpeño VS-535 maize cultivar. International Journal of Molecular Sciences, 20(9): 2079.

LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S., Terzi, M. (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. Theoretical and Applied Genetics, 77: 325-331.

Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S. (2017) Transcriptomics technologies. 13(5): e1005457.

Luhtala, N., Parker, R. (2010) T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. Trends in biochemical sciences, 35(5): 253-259.

Luo, P., Di, D.-W. (2023) Precise regulation of the TAA1/TAR-YUCCA auxin biosynthesis pathway in plants. International Journal of Molecular Sciences, 24(10): 8514.

Lurin, C., Andreés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B. (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. The Plant Cell, 16(8): 2089-2103.

Mackowiak, S. D., Zauber, H., Bielow, C., Thiel, D., Kutz, K., Calviello, L., Mastrobuoni, G., Rajewsky, N., Kempa, S., Selbach, M. (2015) Extensive identification and analysis of conserved small ORFs in animals. Genome biology, 16(1): 1-21.

Magi, A., Semeraro, R., Mingrino, A., Giusti, B., D'aurizio, R. (2018) Nanopore sequencing data analysis: state of the art, applications and challenges. Briefings in bioinformatics, 19(6): 1256-1272.

Magioli, C., Barrôco, R. M., Rocha, C. A. B. c., de Santiago-Fernandes, L. D., Mansur, E., Engler, G., Margis-Pinheiro, M., Sachetto-Martins, G. (2001) Somatic embryo formation in *Arabidopsis* and eggplant is associated with expression of a glycine-rich protein gene (*AtGRP-5*). Plant science, 161(3): 559-567.

Mahdavi-Darvari, F., Noor, N. M. (2017) New insight into early somatic embryogenesis of mangosteen (*Garcinia mangostana*) Through *de novo* and comparative transcriptome analyses. Tropical Plant Biology, 10(1): 30-44.

Maillot, P., Lebel, S., Schellenbaum, P., Jacques, A., Walter, B. (2009) Differential regulation of *SERK*, *LEC1-Like* and pathogenesis-related genes during indirect secondary somatic embryogenesis in grapevine. Plant Physiology and Biochemistry, 47(8): 743-752.

Mangeon, A., Junqueira, R. M., Sachetto-Martins, G. (2010) Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. Plant Signaling & Behavior, 5(2): 99-104.

Mansion, G., Zeltner, L., Bretagnolle, F. (2005) Phylogenetic patterns and polyploid evolution within the mediterranean genus *Centaurium* (Gentianaceae - Chironieae). TAXON, 54(4): 931-950.

Mantione, K. J., Kream, R. M., Kuzelova, H., Ptacek, R., Raboch, J., Samuel, J. M., Stefano, G. B. (2014) Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq. Med Sci Monit Basic Res, 20: 138-142.

Mantiri, F. R., Kurdyukov, S., Lohar, D. P., Sharopova, N., Saeed, N. A., Wang, X.-D., VandenBosch, K. A., Rose, R. J. (2008) The transcription factor MtSERF1 of the ERF subfamily identified by transcriptional profiling is required for somatic embryogenesis induced by auxin plus cytokinin in *Medicago truncatula*. Plant Physiology, 146(4): 1622-1636.

Mardis, E. R. (2017) DNA sequencing technologies: 2006–2016. Nature Protocols, 12(2): 213-218.

Marini, F., Linke, J., Binder, H. (2020) ideal: an R/Bioconductor package for interactive differential expression analysis. BMC Bioinformatics, 21(1): 565.

Marks, D. S., Colwell, L. J., Sheridan, R., Hopf, T. A., Pagnani, A., Zecchina, R., Sander, C. (2011) Protein 3D structure computed from evolutionary sequence variation. PloS one, 6(12): e28766.

Marks, D. S., Hopf, T. A., Sander, C. (2012) Protein structure prediction from sequence variation. Nature biotechnology, 30(11): 1072-1080.

Maroufi, A., Van Bockstaele, E., De Loose, M. (2010) Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. BMC Molecular Biology, 11(1): 15.

Marsoni, M., Bracale, M., Espen, L., Prinsi, B., Negri, A. S., Vannini, C. (2008) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. Plant cell reports, 27: 347-356.

Martin, J. A., Wang, Z. (2011) Next-generation transcriptome assembly. Nat Rev Genet, 12(10): 671-682.

Matera, A. G., Terns, R. M., Terns, M. P. (2007) Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8(3): 209-220.

Matsushima, N., Miyashita, H. (2012) Leucine-Rich Repeat (LRR) Domains containing intervening motifs in plants. Biomolecules, 2(2): 288-311.

Mazri, M. A., Naciri, R., Belkoura, I. (2020) Maturation and conversion of somatic embryos derived from seeds of olive (*Olea europaea* L.) cv. Dahbia: occurrence of secondary embryogenesis and adventitious bud formation. Plants, 9(11): 1489.

McCabe, P. F., Valentine, T. A., Forsberg, L. S., Pennell, R. I. (1997) Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. The Plant Cell, 9(12): 2225-2241.

McGinnis, K., Murphy, N., Carlson, A. R., Akula, A., Akula, C., Basinger, H., Carlson, M., Hermanson, P., Kovacevic, N., McGill, M. A. (2007) Assessing the efficiency of RNA interference for maize functional genomics. Plant physiology, 143(4): 1441-1451.

McKently, A. (1995) Effect of genotype on somatic embryogenesis from axes of mature peanut embryos. Plant cell, tissue and organ culture, 42: 251-254.

Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-la-Peña, C., Loyola-Vargas, V. M. (2019) Signaling overview of plant somatic embryogenesis. Frontiers in plant science, 10: 77.

Michaels, S. D., Amasino, R. M. (1999) *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. The Plant Cell, 11(5): 949-956.

Migocka, M., Papierniak, A. (2011) Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. Molecular Breeding, 28(3): 343-357.

Miller, J. R., Koren, S., Sutton, G. (2010) Assembly algorithms for next-generation sequencing data. Genomics, 95(6): 315-327.

Minutolo, M., Chiaiese, P., Di Matteo, A., Errico, A., Corrado, G. (2020) Accumulation of ascorbic acid in tomato cell culture: Influence of the genotype, source explant and time of *in vitro* cultivation. Antioxidants, 9(3): 222.

Misra, R. C., Sandeep, Kamthan, M., Kumar, S., Ghosh, S. (2016) A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic Arabidopsis. Scientific reports, 6(1): 25340.

Moreno, S., Nurse, P. (1990) Substrates for p34cdc2: in vivo veritas? Cell, 61(4): 549-551.

Moreton, J., Izquierdo, A., Emes, R. D. (2015) Assembly, assessment, and availability of *de novo* generated eukaryotic transcriptomes. Front Genet, 6: 361.

Mostafa, H. H. A., Wang, H., Song, J., Li, X. (2020) Effects of genotypes and explants on garlic callus production and endogenous hormones. Scientific Reports, 10(1): 4867.

Mozgova, I., Hennig, L. (2015) The polycomb group protein regulatory network. Annual review of plant biology, 66: 269-296.

Mozsar, J., Viczian, O. (1996) Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis* spp. Vitis, 35(4): 155-157.

Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3): 473-497.

Naganuma, T., Hirose, T. (2013) Paraspeckle formation during the biogenesis of long non-coding RNAs. RNA biology, 10(3): 456-461.

Nagaraj, N., Wisniewski, J. R., Geiger, T., Cox, J., Kircher, M., Kelso, J., Pääbo, S., Mann, M. (2011) Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. Molecular systems biology, 7(1): 548.

Nair, R. R., Dutta Gupta, S. (2006) High-frequency plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in black pepper (*Piper nigrum* L.). Plant Cell Reports, 24(12): 699-707.

Nakano, M., Sakakibara, T., Watanabe, Y., Mii, M. (1997) Establishment of embryogenic cultures in several cultivars of *Vitis vinifera* and *V. x labruscana*. VITIS-GEILWEILERHOF-, 36: 141-146.

Nakazawa, M., Yabe, N., Ichikawa, T., Yamamoto, Y. Y., Yoshizumi, T., Hasunuma, K., Matsui, M. (2001) *DFL1*, an auxin-responsive *GH3* gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. Plant J, 25(2): 213-221.

Nam, K. H., Li, J. (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. Cell, 110(2): 203-212.

Narita, N. N., Moore, S., Horiguchi, G., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., Goodrich, J., Tsukaya, H. (2004) Overexpression of a novel small peptide ROTUNDIFOLIA4 decreases cell proliferation and alters leaf shape in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 38(4): 699-713.

Narusaka, Y., Narusaka, M., Abe, H., Hosaka, N., Kobayashi, M., Shiraishi, T., Iwabuchi, M. (2009) High-throughput screening for plant defense activators using a β-glucuronidase-reporter gene assay in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biotechnology, 26(3): 345-349.

Necci, M., Piovesan, D., Tosatto, S. C. (2021) Critical assessment of protein intrinsic disorder prediction. Nature methods, 18(5): 472-481.

Necsulea, A., Soumillon, M., Warnefors, M., Liechti, A., Daish, T., Zeller, U., Baker, J. C., Grützner, F., Kaessmann, H. (2014) The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. Nature, 505(7485): 635-640.

Nic-Can, G. I., López-Torres, A., Barredo-Pool, F., Wrobel, K., Loyola-Vargas, V. M., Rojas-Herrera, R., De-la-Peña, C. (2013) New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. PLoS One, 8(8): e72160.

Nic-Can, G. I., Loyola-Vargas, V. M. (2016). The role of the auxins during somatic embryogenesis. Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. V. M. Loyola-Vargas and N. Ochoa-Alejo. Cham, Springer International Publishing**:** 171-182.

Nicot, N., Hausman, J.-F., Hoffmann, L., Evers, D. (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. Journal of Experimental Botany, 56(421): 2907-2914.

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.

Niu, S.-C., Xu, Q., Zhang, G.-Q., Zhang, Y.-Q., Tsai, W.-C., Hsu, J.-L., Liang, C.-K., Luo, Y.-B., Liu, Z.-J. (2016) *De novo* transcriptome assembly databases for the butterfly orchid *Phalaenopsis equestris*. Scientific data, 3(1): 1-11.

Noceda, C., Salaj, T., Pérez, M., Viejo, M., Cañal, M. J., Salaj, J., Rodriguez, R. (2009) DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. Trees, 23: 1285-1293.

Ochatt, S. J., Revilla, M. A. (2016). From stress to embryos: some of the problems for induction and maturation of somatic embryos. *In vitro* Embryogenesis in Higher Plants. M. A. Germana and M. Lambardi. New York, NY, Springer New York**:** 523-536.

Oeller, P. W., Keller, J. A., Parks, J. E., Silbert, J. E., Theologis, A. (1993) Structural characterization of the early indoleacetic acid-inducible genes, PS-IAA4/5 and PS-IAA6, of pea (*Pisum sativum* L.). Journal of molecular biology, 233(4): 789-798.

Ohto, M.-a., Floyd, S. K., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., Harada, J. J. (2009) Effects of APETALA2 on embryo, endosperm, and seed coat development determine seed size in *Arabidopsis*. Sexual plant reproduction, 22: 277-289.

Olexiouk, V., Crappé, J., Verbruggen, S., Verhegen, K., Martens, L., Menschaert, G. (2016) sORFs. org: a repository of small ORFs identified by ribosome profiling. Nucleic acids research, 44(D1): D324-D329.

Opabode, J., Akinyemiju, O., Ayeni, O. (2011) Plant regeneration via somatic embryogenesis from immature leaves in *Tetrapleura tetraptera* (Schum. & Thonn.) Taub. Archives of Biological Sciences, 63(4): 1135-1145.

Oshlack, A., Robinson, M. D., Young, M. D. (2010) From RNA-seq reads to differential expression results. Genome biology, 11: 1-10.

Paniagua-Zambrana, N. Y., Bussmann, R. W. (2020). *Centaurium erythraea* Rafn. Gentianaceae. Ethnobotany of the Andes. N. Y. Paniagua-Zambrana and R. W. Bussmann. Cham, Springer International Publishing**:** 477-480.

Parenicova, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H. E., Ingram, R. M., Kater, M. M., Davies, B. (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. The Plant Cell, 15(7): 1538-1551.

Park, C. J., Park, C. B., Hong, S.-S., Lee, H.-S., Lee, S. Y., Kim, S. C. (2000) Characterization and cDNA cloning of two glycine-and histidine-rich antimicrobial peptides from the roots of shepherd's purse, *Capsella bursa-pastoris*. Plant Molecular Biology, 44: 187-197.

Pavlović, S., Vinterhalter, B., Zdravković-Korać, S., Vinterhalter, D., Zdravković, J., Cvikić, D., Mitić, N. (2013) Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 113(3): 397-406.

Paya-Milans, M., Olmstead, J. W., Nunez, G., Rinehart, T. A., Staton, M. (2018) Comprehensive evaluation of RNA-seq analysis pipelines in diploid and polyploid species. Gigascience, 7(12): giy132.

Pellicer, J., Hidalgo, O., Dodsworth, S., Leitch, I. J. (2018) Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. Genes, 9(2): 88.

Pérez-Jiménez, M., Cantero-Navarro, E., Pérez-Alfocea, F., Le-Disquet, I., Guivarc'h, A., Cos-Terrer, J. (2014) Relationship between endogenous hormonal content and somatic organogenesis in callus of peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivars and *Prunus persica*× *Prunus dulcis* rootstocks. Journal of plant physiology, 171(8): 619-624.

Pérez-Jiménez, M., Carrillo-Navarro, A., Cos-Terrer, J. (2012) Regeneration of peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivars and *Prunus persica*× *Prunus dulcis* rootstocks via organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 108(1): 55-62.

Perkins, J. R., Dawes, J. M., McMahon, S. B., Bennett, D. L. H., Orengo, C., Kohl, M. (2012) ReadqPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. BMC Genomics, 13(1): 296.

Perry, S. E., Nichols, K. W., Fernandez, D. E. (1996) The MADS domain protein AGL15 localizes to the nucleus during early stages of seed development. The Plant Cell, 8(11): 1977-1989.

Petrásek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J. J., Abas, M., Seifertová, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanová, M. (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. Science, 312(5775): 914-918.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., Ferrin, T. E. (2021) UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. Protein Science, 30(1): 70-82.

Phillips, G. C. (2004) *In vitro* morphogenesis in plants-recent advances. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 40: 342-345.

Pietrosemoli, N., Garcia-Martin, J. A., Solano, R., Pazos, F. (2013) Genome-wide analysis of protein disorder in *Arabidopsis thaliana*: implications for plant environmental adaptation. PloS one, 8(2): e55524.

Pila Quinga, L. A., Pacheco de Freitas Fraga, H., do Nascimento Vieira, L., Guerra, M. P. (2017) Epigenetics of long-term somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L.: DNA methylation and recovery of embryogenic potential. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 131(2): 295-305.

Pires, R., Cardoso, H., Ribeiro, A., Peixe, A., Cordeiro, A. (2020) Somatic embryogenesis from mature embryos of *Olea europaea* L. cv.'Galega Vulgar'and long-term management of calli morphogenic capacity. Plants, 9(6): 758.

Polesani, M., Desario, F., Ferrarini, A., Zamboni, A., Pezzotti, M., Kortekamp, A., Polverari, A. (2008) cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. Bmc Genomics, 9: 1-14.

Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W. J., Pandolfi, P. P. (2010) A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. Nature, 465(7301): 1033-1038.

Ponting, C. P. (2001) Issues in predicting protein function from sequence. Briefings in bioinformatics, 2(1): 19-29.

Pop, M., Phillippy, A., Delcher, A. L., Salzberg, S. L. (2004) Comparative genome assembly. Briefings in bioinformatics, 5(3): 237-248.

Prudente, D. d. O., de Souza, L. B., Paiva, R. (2020) Plant somatic embryogenesis: Modulatory role of oxidative stress. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 90: 483-487.

Puigderrajols, P., Mir, G., Molinas, M. (2001) Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). Annals of Botany, 87(2): 179-189.

Qin, Y., Zhao, J. (2006) Localization of arabinogalactan proteins in egg cells, zygotes, and two-celled proembryos and effects of β-D-glucosyl Yariv reagent on egg cell fertilization and zygote division in *Nicotiana tabacum* L. Journal of experimental botany, 57(9): 2061-2074.

Quiroz-Figueroa, F., Méndez-Zeel, M., Larqué-Saavedra, A., Loyola-Vargas, V. (2001) Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. Plant Cell Reports, 20: 679-684.

Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M., Loyola-Vargas, V. M. (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 86(3): 285-301.

R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/.

Rademacher, E. H., Möller, B., Lokerse, A. S., Llavata-Peris, C. I., van den Berg, W., Weijers, D. (2011) A cellular expression map of the *Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family. The Plant Journal, 68(4): 597-606.

Radhamony, R. N., Mohan Prasad, A., Srinivasan, R. (2005) T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. Electronic Journal of Biotechnology, 8(1): 82-106.

Raemakers, C. J. J. M., Jacobsen, E., Visser, R. G. F. (1995) Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. Euphytica, 81(1): 93-107.

Raghavan, V., Kraft, L., Mesny, F., Rigerte, L. (2022) A simple guide to *de novo* transcriptome assembly and annotation. Briefings in Bioinformatics, 23(2).

Ralph, S. G., Hudgins, J., Jancsik, S., Franceschi, V. R., Bohlmann, J. (2007) Aminocyclopropane carboxylic acid synthase is a regulated step in ethylene-dependent induced conifer defense. Full-length cDNA cloning of a multigene family, differential constitutive, and wound-and insect-induced expression, and cellular and subcellular localization in spruce and Douglas fir. Plant Physiology, 143(1): 410-424.

Rampey, R. A., LeClere, S., Kowalczyk, M., Ljung, K., Sandberg, G. r., Bartel, B. (2004) A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during Arabidopsis germination. Plant physiology, 135(2): 978-988.

Reiss, E., Schubert, J., Scholze, P., Krämer, R., Sonntag, K. (2009) The barley thaumatin-like protein Hv-TLP8 enhances resistance of oilseed rape plants to *Plasmodiophora brassicae*. Plant Breeding, 128(2): 210-212.

Remakanthan, A., Menon, T. G., Soniya, E. (2014) Somatic embryogenesis in banana (*Musa acuminata* AAA cv. Grand Naine): effect of explant and culture conditions. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 50: 127-136.

Rensing, S. A., Lang, D., Schumann, E., Reski, R., Hohe, A. (2005) EST sequencing from embryogenic *Cyclamen persicum* cell cultures identifies a high proportion of transcripts homologous to plant genes involved in somatic embryogenesis. Journal of Plant Growth Regulation, 24: 102-115.

Rhoads, A., Au, K. F. (2015) PacBio sequencing and its applications. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 13(5): 278-289.

Rinn, J. L., Chang, H. Y. (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. Annual review of biochemistry, 81: 145-166.

Rizzon, C., Ponger, L., Gaut, B. S. (2006) Striking similarities in the genomic distribution of tandemly arrayed genes in *Arabidopsis* and rice. PLoS computational biology, 2(9): e115.

Robert, N., Ferran, J., Breda, C., Coutos-Thévenot, P., Boulay, M., Buffard, D., Esnault, R. (2001) Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. pisi: Expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. European Journal of Plant Pathology, 107: 249-261.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., Smyth, G. K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. bioinformatics, 26(1): 139-140.

Rodrigo, M. J., Bockel, C., Blervacq, A.-S., Bartels, D. (2004) The novel gene CpEdi-9 from the resurrection plant *C. plantagineum* encodes a hydrophilic protein and is expressed in mature seeds as well as in response to dehydration in leaf phloem tissues. Planta, 219: 579-589.

Röhrig, H., Schmidt, J., Miklashevichs, E., Schell, J., John, M. (2002) Soybean *ENOD40* encodes two peptides that bind to sucrose synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(4): 1915-1920.

Romero-Puertas, M., McCarthy, I., Gómez, M., Sandalio, L., Corpas, F., Del Rio, L., Palma, J. (2004) Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. Plant, Cell & Environment, 27(9): 1135-1148.

Ruff, K. M., Pappu, R. V. (2021) AlphaFold and implications for intrinsically disordered proteins. Journal of Molecular Biology, 433(20): 167208.

Ruiz-Orera, J., Messeguer, X., Subirana, J. A., Alba, M. M. (2014) Long non-coding RNAs as a source of new peptides. elife, 3: e03523.

Sa, B. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry, 55: 4611-4622.

Saab, Y., Mroueh, M., Rizkallah, R. (2004) Hepatoprotective activity of *Centaurium erythraea* on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats.

Sachetto-Martins, G., Franco, L. O., de Oliveira, D. E. (2000) Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 1492(1): 1-14.

Salehin, M., Bagchi, R., Estelle, M. (2015) SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. The Plant Cell, 27(1): 9-19.

Salo, H. M., Sarjala, T., Jokela, A., Häggman, H., Vuosku, J. (2016) Moderate stress responses and specific changes in polyamine metabolism characterize Scots pine somatic embryogenesis. Tree physiology, 36(3): 392-402.

Salzberg, S. L. (2019) Next-generation genome annotation: we still struggle to get it right. Genome Biology, 20(1): 92.

Sato, A., Yamamoto, K. T. (2008) Overexpression of the non-canonical Aux/IAA genes causes auxin-related aberrant phenotypes in *Arabidopsis*. Physiologia plantarum, 133(2): 397-405.

Sato, S., Toya, T., Kawahara, R., Whittier, R. F., Fukuda, H., Komamine, A. (1995) Isolation of a carrot gene expressed specifically during early-stage somatic embryogenesis. Plant molecular biology, 28: 39-46.

Schaller, G. E., Bishopp, A., Kieber, J. J. (2015) The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. The Plant Cell, 27(1): 44-63.

Schat, H., Ouborg, J., Wit, R. d. (1989) Life history and plant architecture: size-dependent reproductive allocation in annual and biennial *Centaurium* species. Acta botanica neerlandica, 38(2): 183-201.

Schenk, M. F., Cordewener, J. H., America, A. H., Van't Westende, W. P., Smulders, M. J., Gilissen, L. J. (2009) Characterization of PR-10 genes from eight *Betula* species and detection of Bet v 1 isoforms in birch pollen. BMC plant biology, 9: 1-15.

Schlögl, P. S., dos Santos, A. L. W., do Nascimento Vieira, L., Floh, E. I. S., Guerra, M. P. (2012) Gene expression during early somatic embryogenesis in Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 108: 173-180.

Schmidt, E. D. L., Guzzo, F., Toonen, M. A. J., Vries, S. C. d. (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. Development, 124(10): 2049-2062.

Schmidt, G. W., Delaney, S. K. (2010) Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. Molecular Genetics and Genomics, 283(3): 233-241.

Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc, 3(6): 1101-1108.

Schneeberger, K., Ossowski, S., Ott, F., Klein, J. D., Wang, X., Lanz, C., Smith, L. M., Cao, J., Fitz, J., Warthmann, N. (2011) Reference-guided assembly of four diverse *Arabidopsis thaliana* genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(25): 10249-10254.

Schouppe, D., Brys, R., Vallejo-Marin, M., Jacquemyn, H. (2017) Geographic variation in floral traits and the capacity of autonomous selfing across allopatric and sympatric populations of two closely related *Centaurium* species. Scientific Reports, 7(1): 46410.

Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., Weigel, D. (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. The Plant Cell, 18(5): 1121-1133.

Schwab, R., Ossowski, S., Warthmann, N., Weigel, D. (2010) Directed gene silencing with artificial microRNAs. Plant microRNAs: Methods and protocols: 71-88.

Sharma, S. K., Millam, S., Hedley, P. E., McNicol, J., Bryan, G. J. (2008) Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: an auxin led perspective. Plant Molecular Biology, 68: 185-201.

Shen, Y., Jiang, Z., Lu, S., Lin, H., Gao, S., Peng, H., Yuan, G., Liu, L., Zhang, Z., Zhao, M., Rong, T., Pan, G. (2013) Combined small RNA and degradome sequencing reveals microRNA regulation during immature maize embryo dedifferentiation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 441(2): 425-430.

Sherp, A. M., Westfall, C. S., Alvarez, S., Jez, J. M. (2018) *Arabidopsis thaliana* GH3. 15 acyl acid amido synthetase has a highly specific substrate preference for the auxin precursor indole-3-butyric acid. Journal of Biological Chemistry, 293(12): 4277-4288.

Shi, H., Kim, Y., Guo, Y., Stevenson, B., Zhu, J.-K. (2003) The Arabidopsis SOS5 locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. The Plant Cell, 15(1): 19-32.

Shi, X., Zhang, C., Liu, Q., Zhang, Z., Zheng, B., Bao, M. (2016) *De novo* comparative transcriptome analysis provides new insights into sucrose induced somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.). BMC genomics, 17(1): 1-18.

Shin, J., Seo, P. J. (2018) Varying auxin levels induce distinct pluripotent states in callus cells. Frontiers in Plant Science, 9: 1653.

Shindyalov, I., Kolchanov, N., Sander, C. (1994) Can three-dimensional contacts in protein structures be predicted by analysis of correlated mutations Protein Engineering, Design and Selection, 7(3): 349-358.

Shuai, P., Liang, D., Tang, S., Zhang, Z., Ye, C.-Y., Su, Y., Xia, X., Yin, W. (2014) Genome-wide identification and functional prediction of novel and drought-responsive lincRNAs in *Populus trichocarpa*. Journal of experimental botany, 65(17): 4975-4983.

Šiler, B., Avramov, S., Banjanac, T., Cvetković, J., Živković, J. N., Patenković, A., Mišić, D. (2012) Secoiridoid glycosides as a marker system in chemical variability estimation and chemotype assignment of *Centaurium erythraea* Rafn from the Balkan Peninsula. Industrial Crops and Products, 40: 336-344.

Šiler, B., Mišić, D. (2016). Biologically active compounds from the genus *Centaurium* sl (Gentianaceae): current knowledge and future prospects in medicine. Studies in natural products chemistry. **49:** 363-397.

Šiler, B., Mišić, D., Filipović, B., Popović, Z., Cvetić, T., Mijović, A. (2007) Effects of salinity on in vitro growth and photosynthesis of common centaury (*Centaurium erythraea* Rafn.). Archives of Biological Sciences, 59(2): 129-134.

Šiler, B., Živković, S., Banjanac, T., Cvetković, J., Živković, J. N., Ćirić, A., Soković, M., Mišić, D. (2014) Centauries as underestimated food additives: Antioxidant and antimicrobial potential. Food chemistry, 147: 367-376.

Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., Zdobnov, E. M. (2015) BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics, 31(19): 3210-3212.

Simonović, A. D., Filipović, B. K., Trifunović, M. M., Malkov, S. N., Milinković, V. P., Jevremović, S. B., Subotić, A. R. (2015) Plant regeneration in leaf culture of *Centaurium erythraea* Rafn. Part 2: The role of arabinogalactan proteins. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 121: 721-739.

Simonović, A. D., M. Trifunović-Momčilov, M., Filipović, B. K., Marković, M. P., Bogdanović, M. D., Subotić, A. R. (2020) Somatic embryogenesis in *Centaurium erythraea* Rafn. - current status and perspectives: A review. Plants, 10(1): 70.

Singla, B., Khurana, J. P., Khurana, P. (2008) Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. Plant Cell Reports, 27(5): 833-843.

Singla, B., Tyagi, A. K., Khurana, J. P., 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 Molecular Biology, 65: 677-692.

Skoog, F. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol.

Slatko, B. E., Gardner, A. F., Ausubel, F. M. (2018) Overview of next-generation sequencing technologies. Current Protocols in Molecular Biology, 122(1): e59.

Soltabayeva, A., Dauletova, N., Serik, S., Sandybek, M., Omondi, J. O., Kurmanbayeva, A. (2022) Receptor-like Kinases (LRR-RLKs) in response of plants to biotic and abiotic stresses. 11(19).

Somleva, M. N., Schmidt, E. D. L., de Vries, S. C. (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. Plant Cell Reports, 19(7): 718-726.

Soriano Maria (2017, January 12). Plasmids 101: Gateway Cloning. Dostupno na: https://blog.addgene.org/plasmids-101-gateway-cloning.

Srivastava, S., Emery, R. N., Kurepin, L. V., Reid, D. M., Fristensky, B., Kav, N. N. (2006) Pea PR 10.1 is a ribonuclease and its transgenic expression elevates cytokinin levels. Plant Growth Regulation, 49: 17-25.

Stärk, H., Dallago, C., Heinzinger, M., Rost, B. (2021) Light attention predicts protein location from the language of life. Bioinformatics Advances, 1(1).

Stark, R., Grzelak, M., Hadfield, J. (2019) RNA sequencing: the teenage years. Nature Reviews Genetics, 20(11): 631-656.

Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C., Suza, W. (2005) Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. Plant Cell, 17(2): 616-627.

Steiner, N., Santa-Catarina, C., Guerra, M. P., Cutri, L., Dornelas, M. C., Floh, E. I. (2012) A gymnosperm homolog of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1* (*SERK1*) is expressed during somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 109: 41-50.

Steinmacher, D. A., Saare-Surminski, K., Lieberei, R. (2012) Arabinogalactan proteins and the extracellular matrix surface network during peach palm somatic embryogenesis. Physiologia Plantarum, 146(3): 336-349.

Sterckx, Y. G., Volkov, A. N., Vranken, W. F., Kragelj, J., Jensen, M. R., Buts, L., Garcia-Pino, A., Jové, T., Van Melderen, L., Blackledge, M. (2014) Small-angle X-ray scattering-and nuclear magnetic resonance-derived conformational ensemble of the highly flexible antitoxin PaaA2. Structure, 22(6): 854-865.

Stevens, P. (2001). Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017.

Stone, S. L., Braybrook, S. A., Paula, S. L., Kwong, L. W., Meuser, J., Pelletier, J., Hsieh, T.-F., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., Harada, J. J. (2008) *Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2* induces maturation traits and auxin activity: implications for somatic embryogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(8): 3151-3156.

Storey, J. D., Tibshirani, R. (2003) Statistical significance for genomewide studies. Proceedings of the National Academy of Science, 100: 9440-9445.

Su, N., He, K., Jiao, Y., Chen, C., Zhou, J., Li, L., Bai, S., Li, X., Deng, X. W. (2007) Distinct reorganization of the genome transcription associates with organogenesis of somatic embryo, shoots, and roots in rice. Plant Molecular Biology, 63: 337-349.

Su, Y. H., Tang, L. P., Zhao, X. Y., Zhang, X. S. (2021) Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. Journal of Integrative Plant Biology, 63(1): 228-243.

Su, Y. H., Zhang, X. S. (2014) The hormonal control of regeneration in plants. Curr Top Dev Biol, 108: 35-69.

Subotić, A., Budimir, S., Grubišić, D., Momčilović, I. (2003) Direct regeneration of shoots from hairy root cultures of *Centaurium erythraea* inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. Biologia Plantarum, 47(4): 617-619.

Subotić, A., Grubišić, D. (2007) Histological analysis of somatic embryogenesis and adventitious shoot formation from root explants of *Centaurium erythreae* Gillib. Biologia Plantarum, 51(3): 514-516.

Subotić, A., Jankovic, T., Jevremovic, S., Grubišic, D. (2006). Plant tissue culture and secondary metabolites productions of *Centaurium erythraea* Rafn., a medical plant. Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical**:** 564-570.

Subotić, A., Jevremović, S., Grubišić, D. (2009a) Influence of cytokinins on *in vitro* morphogenesis in root cultures of *Centaurium erythraea* - valuable medicinal plant. Scientia horticulturae, 120(3): 386-390.

Subotić, A., Jevremović, S., Grubišić, D., Janković, T. (2009b) Spontaneous plant regeneration and production of secondary metabolites from hairy root cultures of *Centaurium erythraea* Rafn. Protocols for *in vitro* cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants: 205-215.

Subotić, A., Jevremovic, S., Trifunovic, M., Petric, M., Miloševic, S., Grubišic, D. (2009c) The influence of gibberellic acid and paclobutrazol on induction of somatic embryogenesis in wild type and hairy root cultures of *Centaurium erythraea* Gillib. African Journal of Biotechnology, 8(14).

Suhasini, K., Sagare, A., Sainkar, S., Krishnamurthy, K. (1997) Comparative study of the development of zygotic and somatic embryos of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Science, 128(2): 207-216.

Sun, Q., Csorba, T., Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N. J., Dean, C. (2013) R-loop stabilization represses antisense transcription at the *Arabidopsis* FLC locus. Science, 340(6132): 619-621.

Sundararajan, S., Sivaraman, B., Rajendran, V., Ramalingam, S. (2017) Tissue culture and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation studies in four commercially important indica rice cultivars. Journal of Crop Science and Biotechnology, 20: 175-183.

Suzuki, M., Yamazaki, C., Mitsui, M., Kakei, Y., Mitani, Y., Nakamura, A., Ishii, T., Soeno, K., Shimada, Y. (2015) Transcriptional feedback regulation of *YUCCA* genes in response to auxin levels in *Arabidopsis*. Plant Cell Reports, 34(8): 1343-1352.

Swiezewski, S., Liu, F., Magusin, A., Dean, C. (2009) Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. Nature, 462(7274): 799-802.

Szewczyk-Taranek, B., Pawłowska, B. (2015) Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration from seedlings of *Hepatica nobilis* Schreb. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 120(3): 1203-1207.

Tanaka, M., Kikuchi, A., Kamada, H. (2008) The *Arabidopsis* histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination. Plant physiology, 146(1): 149-161.

Tao, Y., Ferrer, J.-L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J. A., Li, L., Moreno, J. E., Bowman, M. E., Ivans, L. J. (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. Cell, 133(1): 164-176.

Tay, Y., Rinn, J., Pandolfi, P. P. (2014) The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition. Nature, 505(7483): 344-352.

Tchorbadjieva, M. I. (2016) Advances in proteomics of somatic embryogenesis. Somatic embryogenesis in ornamentals and its applications: 67-90.

Thakare, D., Tang, W., Hill, K., Perry, S. E. (2008) The MADS-domain transcriptional regulator AGAMOUS-LIKE15 promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* and soybean. Plant Physiol, 146(4): 1663-1672.

Theologis, A., Huynh, T. V., Davis, R. W. (1985) Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. Journal of molecular biology, 183(1): 53-68.

Thibaud-Nissen, F., Shealy, R. T., Khanna, A., Vodkin, L. O. (2003) Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. Plant Physiology, 132(1): 118-136.

Thompson, H. J., Knox, J. P. (1998) Stage-specific responses of embryogenic carrot cell suspension cultures to arabinogalactan protein-binding β-glucosyl Yariv reagent. Planta, 205: 32-38.

Thornton, J. W., DeSalle, R. (2000) Gene family evolution and homology: genomics meets phylogenetics. Annual review of genomics and human genetics, 1(1): 41-73.

Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.-Q., Jin, J., Gao, G. (2019) PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. Nucleic Acids Research, 48(D1): D1104-D1113.

Tian, R., Paul, P., Joshi, S., Perry, S. E. (2020) Genetic activity during early plant embryogenesis. Biochem J, 477(19): 3743-3767.

Tompa, P. (2005) The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. FEBS letters, 579(15): 3346-3354.

Tompa, P. (2012) Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. Trends in biochemical sciences, 37(12): 509-516.

Torrens-Spence, M., Fallon, T., Weng, J. (2016). A workflow for studying specialized metabolism in nonmodel eukaryotic organisms. Methods in Enzymology, Elsevier. **576:** 69-97.

Trapnell, C., Hendrickson, D. G., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J. L., Pachter, L. (2013) Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. Nature biotechnology, 31(1): 46-53.

Trebal, J., Beopoulos, N., Esnault, R. (1979) Ribonuclease activities in bean roots. Phytochemistry, 18(10): 1635-1637.

Trewavas, A. (1981) How do plant growth substances work? Plant, Cell & Environment, 4(3): 203-228.

Trifunović-Momčilov, M., Motyka, V., Dragićević, I. Č., Petrić, M., Jevremović, S., Malbeck, J., Holík, J., Dobrev, P. I., Subotić, A. (2016) Endogenous phytohormones in spontaneously regenerated *Centaurium erythraea* Rafn. plants grown *in vitro*. Journal of Plant Growth Regulation, 35: 543-552.

Trifunović-Momčilov, M., Paunović, D., Milošević, S., Marković, M., Jevremović, S., Dragićević, I. Č., Subotić, A. (2020) Salinity stress response of non-transformed and *AtCKX* transgenic centaury (*Centaurium erythraea* Rafn.) shoots and roots grown *in vitro*. Annals of Applied Biology, 177(1): 74-89.

Trifunović-Momčilov, M., Cingel, A., Simonović, A., Jevremović, S., Petrić, M., Dragićević, I. Č., Motyka, V., Dobrev, P. I., Zahajská, L., Subotić, A. (2013) Overexpression of *Arabidopsis* cytokinin oxidase/dehydrogenase genes AtCKX1 and AtCKX2 in transgenic *Centaurium erythraea* Rafn. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 115: 139-150.

Trifunović-Momčilov, M., Motyka, V., Cingel, A., Subotić, A., Jevremović, S., Petrić, M., Holík, J., Malbeck, J., Dobrev, P. I., Dragićević, I. Č. (2015) Changes in cytokinin content and altered cytokinin homeostasis in *AtCKX1* and *AtCKX2*-overexpressing centaury (*Centaurium erythraea* Rafn.) plants grown *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 120: 767-777.

Trifunović, M., Subotić, A., Petrić, M., Jevremović, S. (2015) The role of arabinogalactan proteins in morphogenesis of *Centaurium erythraea* Rafn. *in vitro*. The Gentianaceae-volume 2: biotechnology and applications: 113-138.

Trifunović-Momčilov, M., Tadić, V., Petrić, M., Jontulović, D., Jevremović, S., Subotić, A. (2014) Quantification of arabinogalactan proteins during *in vitro* morphogenesis induced by β-d-glucosyl Yariv reagent in *Centaurium erythraea* root culture. Acta physiologiae plantarum, 36: 1187-1195.

Tromas, A., Perrot-Rechenmann, C. (2010) Recent progress in auxin biology. Comptes Rendus Biologies, 333(4): 297-306.

Tsuchisaka, A., Theologis, A. (2004) Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. Plant Physiology, 136(2): 2982-3000.

Tu, L., Zhang, X., Liu, D., Jin, S., Cao, J., Zhu, L., Deng, F., Tan, J., Zhang, C. (2007) Suitable internal control genes for qRT-PCR normalization in cotton fiber development and somatic embryogenesis. Chinese Science Bulletin, 52(22): 3110-3117.

Tuluce, Y., Ozkol, H., Koyuncu, I., Ine, H. (2011) Gastroprotective effect of small centaury (Centaurium erythraea L) on aspirin-induced gastric damage in rats. Toxicology and Industrial Health, 27(8): 760-768.

Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z., Green, T., Zielinski, M., Žídek, A., Bridgland, A., Cowie, A., Meyer, C., Laydon, A. (2021) Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. Nature, 596(7873): 590-596.

Ubsdell, R. (1976) Studies on variation and evolution in *Centaurium erythraea* Rafn. and *C. littorale* (D. Turner) Gilmour in the British Isles 2. Cytology. Watsonia, 11: 33-43.

Uversky, V. N. (2021) The protein disorder cycle. Biophysical Reviews, 13(6): 1155-1162.

Valdés, A. E., Ordás, R. J., Fernández, B., Centeno, M. L. (2001) Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. Plant Physiology and Biochemistry, 39(5): 377-384.

Valentão, P., Andrade, P. B., Silva, E., Vicente, A., Santos, H., Bastos, M. L., Seabra, R. M. (2002) Methoxylated xanthones in the quality control of small centaury (*Centaurium erythraea*) flowering tops. Journal of agricultural and food chemistry, 50(3): 460-463.

van der Wel, H., Loeve, K. (1972) Isolation and characterization of Thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. European Journal of Biochemistry, 31(2): 221-225.

van Heesch, S., van Iterson, M., Jacobi, J., Boymans, S., Essers, P. B., de Bruijn, E., Hao, W., MacInnes, A. W., Cuppen, E., Simonis, M. (2014) Extensive localization of long noncoding RNAs to the cytosol and mono-and polyribosomal complexes. Genome biology, 15(1): 1-12.

Van Loon, L. C., Van Strien, E. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and molecular plant pathology, 55(2): 85-97.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology, 3(7): research0034.0031.

Varner, J., Cassab, G. (1986) Molecular biology: A new protein in petunia. Nature, 323(6084): 110-110.

Vaucheret, H. (2005) MicroRNA-dependent trans-acting siRNA production. Science's STKE, 2005(300): pe43-pe43.

Verdeil, J.-L., Alemanno, L., Niemenak, N., Tranbarger, T. J. (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? Trends in plant science, 12(6): 245-252.

von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L. (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 69: 233-249.

Wan, H., Zhao, Z., Qian, C., Sui, Y., Malik, A. A., Chen, J. (2010) Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. Analytical Biochemistry, 399(2): 257-261.

Wang, H.-L. V., Chekanova, J. A. (2017) Long noncoding RNAs in plants. Long non coding RNA biology: 133-154.

Wang, H., Caruso, L. V., Downie, A. B., Perry, S. E. (2004) The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. The Plant Cell, 16(5): 1206-1219.

Wang, K. C., Chang, H. Y. (2011) Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. Molecular cell, 43(6): 904-914.

Wang, L., Feng, Z., Wang, X., Wang, X., Zhang, X. (2010) DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. Bioinformatics, 26(1): 136-138.

Wang, M.-L., Li, Q.-H., Xin, H.-H., Chen, X., Zhu, X.-J., Li, X.-H. (2017) Reliable reference genes for normalization of gene expression data in tea plants (*Camellia sinensis*) exposed to metal stresses. PLOS ONE, 12(4): e0175863.

Wang, P., Moore, B. M., Panchy, N. L., Meng, F., Lehti-Shiu, M. D., Shiu, S.-H. (2018) Factors Influencing Gene Family Size Variation Among Related Species in a Plant Family, Solanaceae. Genome Biology and Evolution, 10(10): 2596-2613.

Wang, Y., Li, X., Zhou, W., Li, T., Tian, C. (2016) *De novo* assembly and transcriptome characterization of spruce dwarf mistletoe *Arceuthobium sichuanense* uncovers gene expression profiling associated with plant development. BMC Genomics, 17(1): 771.

Ward, J. H. (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. Journal of the American Statistical Association, 58(301): 236-244.

Warnes, G., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Liaw, W., Lumley, T., Maechler, M., Magnusson, A., Moeller, S., Schwartz, M. (2019). gplots: various R programming tools for plotting data. R package version 3.0. 1.1. 2019.

Wasaki, J., Yonetani, R., Shinano, T., Kai, M., Osaki, M. (2003) Expression of the *OsPI1* gene, cloned from rice roots using cDNA microarray, rapidly responds to phosphorus status. New Phytologist, 158(2): 239-248.

Waterhouse, R. M., Seppey, M., Simão, F. A., Manni, M., Ioannidis, P., Klioutchnikov, G., Kriventseva, E. V., Zdobnov, E. M. (2017) BUSCO applications from quality assessments to gene prediction and phylogenomics. Molecular Biology and Evolution, 35(3): 543-548.

Wells, C. E., Vendramin, E., Jimenez Tarodo, S., Verde, I., Bielenberg, D. G. (2015) A genome-wide analysis of MADS-box genes in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. BMC Plant Biology, 15(1): 41.

Wen, J., Lease, K. A., Walker, J. C. (2004) DVL, a novel class of small polypeptides: overexpression alters *Arabidopsis* development. The Plant Journal, 37(5): 668-677.

Wickramasuriya, A. M., Dunwell, J. M. (2015) Global scale transcriptome analysis of *Arabidopsis* embryogenesis *in vitro*. BMC genomics, 16: 1-23.

Williams, E., Maheswaran, G. (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Annals of botany, 57(4): 443-462.

Winchcombe, C. F., Bewley, J. D. (1992) Changes in ribonucleic acid and polyribosomes as related to ribonuclease activities during development and germination of the castor bean seed. Phytochemistry, 31(8): 2591-2597.

Wiśniewska, A., Grabowska, A., Pietraszewska-Bogiel, A., Tagashira, N., Zuzga, S., Wóycicki, R., Przybecki, Z., Malepszy, S., Filipecki, M. (2012) Identification of genes up-regulated during somatic embryogenesis of cucumber. Plant Physiology and Biochemistry, 50: 54-64.

Wójcik, A. M., Nodine, M. D., Gaj, M. D. (2017) miR160 and miR166/165 contribute to the LEC2-mediated auxin response involved in the somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. Frontiers in Plant Science, 8: 2024.

Wójcik, A. M., Wójcikowska, B., Gaj, M. D. (2020) Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. International Journal of Molecular Sciences, 21(4): 1333.

Wójcikowska, B., Jaskóła, K., Gąsiorek, P., Meus, M., Nowak, K., Gaj, M. D. (2013) LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) promotes embryogenic induction in somatic tissues of *Arabidopsis*, via YUCCA-mediated auxin biosynthesis. Planta, 238: 425-440.

Wójcikowska, B., Wójcik, A. M., Gaj, M. D. (2020) Epigenetic regulation of auxin-induced somatic embryogenesis in plants. International Journal of Molecular Sciences, 21(7): 2307.

Wu, S., Zhu, Z., Fu, L., Niu, B., Li, W. (2011) WebMGA: a customizable web server for fast metagenomic sequence analysis. BMC Genomics, 12(1): 444.

Wu, X., Li, F., Zhang, C., Liu, C., Zhang, X. (2009) Differential gene expression of cotton cultivar CCRI24 during somatic embryogenesis. Journal of plant physiology, 166(12): 1275-1283.

Xu, L., Huang, H. (2014) Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. Current topics in developmental biology, 108: 1-33.

Xu, M., Li, X., Korban, S. S. (2004) DNA-methylation alterations and exchanges during *in vitro* cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.). Theoretical and Applied Genetics, 109: 899-910.

Xu, M., Zhang, B., Su, X., Zhang, S., Huang, M. (2011) Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in Populus. Analytical Biochemistry, 408(2): 337-339.

Xu, N., Bewley, J. D. (1992) Contrasting pattern of somatic and zygotic embryo development in alfalfa (*Medicago sativa* L.) as revealed by scanning electron microscopy. Plant Cell Reports, 11: 279-284.

Xu, Y., Buchholz, W. G., DeRose, R. T., Hall, T. C. (1995) Characterization of a rice gene family encoding root-specific proteins. Plant Molecular Biology, 27: 237-248.

Yakovlev, I. A., Carneros, E., Lee, Y., Olsen, J. E., Fossdal, C. G. (2016) Transcriptional profiling of epigenetic regulators in somatic embryos during temperature induced formation of an epigenetic memory in Norway spruce. Planta, 243: 1237-1249.

Yamamoto, M., Yamamoto, K. T. (1998) Differential effects of 1-naphthaleneacetic acid, indole-3-acetic acid and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on the gravitropic response of roots in an auxin-resistant mutant of *Arabidopsis*, auxl. Plant and Cell Physiology, 39(6): 660-664.

Yan, X., Zhang, X., Lu, M., He, Y., An, H. (2015) *De novo* sequencing analysis of the *Rosa roxburghii* fruit transcriptome reveals putative ascorbate biosynthetic genes and EST-SSR markers. Gene, 561(1): 54-62.

Yang, X., Zhang, X. (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. Critical Reviews in Plant Sciences, 29(1): 36-57.

Yang, X., Zhang, X., Yuan, D., Jin, F., Zhang, Y., Xu, J. (2012) Transcript profiling reveals complex auxin signalling pathway and transcription regulation involved in dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton. BMC plant biology, 12(1): 1-19.

Yasuda, H., Nakajima, M., Ito, T., Ohwada, T., Masuda, H. (2001) Partial characterization of genes whose transcripts accumulate preferentially in cell clusters at the earliest stage of carrot somatic embryogenesis. Plant Molecular Biology, 45(6): 705-712.

Yoon, J.-H., Abdelmohsen, K., Gorospe, M. (2014). Functional interactions among microRNAs and long noncoding RNAs. Seminars in cell & developmental biology, Elsevier.

You, C. R., Fan, T. J., Gong, X. Q., Bian, F. H., Liang, L. K., Qu, F. N. (2011) A high-frequency cyclic secondary somatic embryogenesis system for *Cyclamen persicum* Mill. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 107(2): 233-242.

Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., Hwang, J. K. (2006) Prediction of protein subcellular localization. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 64(3): 643-651.

Yumbla-Orbes, M., da Cruz, A. C. F., Pinheiro, M. V. M., Rocha, D. I., Batista, D. S., Koehler, A. D., Barbosa, J. G., Otoni, W. C. (2017) Somatic embryogenesis and *de novo* shoot organogenesis can be alternatively induced by reactivating pericycle cells in Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinners) root explants. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 53: 209-218.

Zavattieri, M. A., Frederico, A. M., Lima, M., Sabino, R., Arnholdt-Schmitt, B. (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. Electronic Journal of Biotechnology, 13(1): 12-13.

Zhang, C.-C., Wang, L.-Y., Wei, K., Wu, L.-Y., Li, H.-L., Zhang, F., Cheng, H., Ni, D.-J. (2016) Transcriptome analysis reveals self-incompatibility in the tea plant (*Camellia sinensis*) might be under gametophytic control. BMC Genomics, 17(1): 359.

Zhang, Q., Chen, J., Henny, R. J. (2005) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, petiole, and stem explants of golden pothos. Plant Cell Reports, 23(9): 587-595.

Zhang, S., Liu, X., Lin, Y., Xie, G., Fu, F., Liu, H., Wang, J., Gao, S., Lan, H., Rong, T. (2011) Characterization of a *ZmSERK* gene and its relationship to somatic embryogenesis in a maize culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 105: 29-37.

Zhang, Y.-C., Zhou, Y.-F., Cheng, Y., Huang, J.-H., Lian, J.-P., Yang, L., He, R.-R., Lei, M.-Q., Liu, Y.-W., Yuan, C., Zhao, W.-L., Xiao, S., Chen, Y.-Q. (2022) Genome-wide analysis and functional annotation of chromatin-enriched noncoding RNAs in rice during somatic cell regeneration. Genome Biology, 23(1): 28.

Zhao, P., Begcy, K., Dresselhaus, T., Sun, M.-X. (2017) Does early embryogenesis in eudicots and monocots involve the same mechanism and molecular players? Plant Physiology, 173(1): 130-142.

Zhao, Y. (2012) Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. Molecular plant, 5(2): 334-338.

Zheng, Q., Zheng, Y., Ji, H., Burnie, W., Perry, S. E. (2016) Gene regulation by the AGL15 transcription factor reveals hormone interactions in somatic embryogenesis. Plant Physiology, 172(4): 2374-2387.

Zhou, D., Gao, S., Wang, H., Lei, T., Shen, J., Gao, J., Chen, S., Yin, J., Liu, J. (2016) *De novo* sequencing transcriptome of endemic *Gentiana straminea* (Gentianaceae) to identify genes involved in the biosynthesis of active ingredients. Gene, 575(1): 160-170.

Zhu, Q.-H., Wang, M.-B. (2012) Molecular Functions of Long Non-Coding RNAs in Plants. Genes, 3(1): 176-190.

Zhu, Q. H., Stephen, S., Taylor, J., Helliwell, C. A., Wang, M. B. (2014) Long noncoding RNA s responsive to *Fusarium oxysporum* infection in *Arabidopsis thaliana*. New Phytologist, 201(2): 574-584.

Zhu, S.-p., Wang, J., Ye, J.-l., Zhu, A.-D., Guo, W.-w., Deng, X.-x. (2014) Isolation and characterization of *LEAFY COTYLEDON 1-LIKE* gene related to embryogenic competence in *Citrus sinensis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 119: 1-13.

Zhu, X., Li, X., Chen, W., Chen, J., Lu, W., Chen, L., Fu, D. (2012) Evaluation of new reference genes in papaya for accurate transcript normalization under different experimental conditions. PLOS ONE, 7(8): e44405.

Zhuang, H., Fu, Y., He, W., Wang, L., Wei, Y. (2015) Selection of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR in *Oxytropis ochrocephala* Bunge using transcriptome datasets under abiotic stress treatments. Frontiers in plant science, 6: 475.

Zimmerman, J. L. (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. The plant cell, 5(10): 1411.

Živković, S., Dević, M., Filipović, B., Giba, Z., Grubišić, D. (2007) Effect of NaCl on seed germination in some *Centaurium* Hill. species (Gentianaceae). Archives of Biological Sciences, 59(3): 227-231.

Zou, S., Yao, X., Zhong, C., Li, D., Wang, Z., Huang, H. (2019) Recurrent somatic embryogenesis and development of somatic embryos in *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz (Lardizabalaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 139: 493-504.

Zubko, E., Meyer, P. (2007) A natural antisense transcript of the *Petunia hybrida* Sho gene suggests a role for an antisense mechanism in cytokinin regulation. The Plant Journal, 52(6): 1131-1139.

Zuo, J., Niu, Q.-W., Frugis, G., Chua, N.-H. (2002) The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 30(3): 349-359.

8. Prilozi

8.1. Ekspresija odabranih gena iz transkriptoma u uzorcima listova pre induktivnog tretmana i nakon četiri nedelje od indukcije SE

Pri merenju ekspresije u genotipovima sa različitim regenerativnim potencijalom embriogenog kalusa utvrđeno je da se ekspresija može meriti samo u embriogenom tkivu, s obzirom na to da veliki broj uzoraka listova rozete (**rl**) pre tretmana sa 0,1 mgl^{-1} 2,4-D i 0,25 mgl^{-1} CPPU i listova sa kojih je skinuto embriogeno tkivo nakon četiri nedelje od indukcije SE (ostatak lista) nije imao očitanu ekspresiju. Ovo je posledica kriterijuma za biranje transkripata prema kome bi *FPKM* vrednost u listovima rozete trebalo da bude nula ili blizu nule.

Genotip	Uzorak tkiva	Ct	Gen
1	list rozete	35,784	*CeNA1*
1	ostatak lista	33,955	*CeNA1*
5	list rozete	36,514	*CeNA1*
5	ostatak lista	34,686	*CeNA1*
6	list rozete	Nedetektovan	*CeNA1*
6	ostatak lista	Nedetektovan	*CeNA1*
9	list rozete	Nedetektovan	*CeNA1*
9	ostatak lista	Nedetektovan	*CeNA1*
10	list rozete	35,080	*CeNA1*
10	ostatak lista	26,394	*CeNA1*
11	list rozete	35,413	*CeNA1*
11	ostatak lista	35,685	*CeNA1*
12	list rozete	Nedetektovan	*CeNA1*
12	ostatak lista	35,661	*CeNA1*
15	list rozete	Nedetektovan	*CeNA1*
15	ostatak lista	35,618	*CeNA1*
17	list rozete	Nedetektovan	*CeNA1*
17	ostatak lista	Nedetektovan	*CeNA1*
19	list rozete	34,848	*CeNA1*
19	ostatak lista	35,889	*CeNA1*
22	list rozete	37,905	*CeNA1*
22	ostatak lista	Nedetektovan	*CeNA1*
25	list rozete	Nedetektovan	*CeNA1*
25	ostatak lista	34,729	*CeNA1*
26	list rozete	33,430	*CeNA1*
26	ostatak lista	Nedetektovan	*CeNA1*
27	list rozete	Nedetektovan	*CeNA1*
27	ostatak lista	33,836	*CeNA1*
28	list rozete	34,968	*CeNA1*
28	ostatak lista	Nedetektovan	*CeNA1*
29	list rozete	36,310	*CeNA1*
29	ostatak lista	Nedetektovan	*CeNA1*
30	list rozete	33,574	*CeNA1*
30	ostatak lista	35,257	*CeNA1*
36	list rozete	35,555	*CeNA1*
36	ostatak lista	Nedetektovan	*CeNA1*

1	list rozete	Nedetektovan	*CeTLP1-like*
1	ostatak lista	32,031	*CeTLP1-like*
5	list rozete	Nedetektovan	*CeTLP1-like*
5	ostatak lista	34,229	*CeTLP1-like*
6	list rozete	36,119	*CeTLP1-like*
6	ostatak lista	34,069	*CeTLP1-like*
9	list rozete	36,917	*CeTLP1-like*
9	ostatak lista	36,550	*CeTLP1-like*
10	list rozete	Nedetektovan	*CeTLP1-like*
10	ostatak lista	30,898	*CeTLP1-like*
11	list rozete	33,818	*CeTLP1-like*
11	ostatak lista	35,507	*CeTLP1-like*
12	list rozete	36,516	*CeTLP1-like*
12	ostatak lista	33,158	*CeTLP1-like*
15	list rozete	33,702	*CeTLP1-like*
15	ostatak lista	Nedetektovan	*CeTLP1-like*
17	list rozete	Nedetektovan	*CeTLP1-like*
17	ostatak lista	34,883	*CeTLP1-like*
19	list rozete	36,830	*CeTLP1-like*
19	ostatak lista	32,300	*CeTLP1-like*
22	list rozete	34,869	*CeTLP1-like*
22	ostatak lista	Nedetektovan	*CeTLP1-like*
25	list rozete	Nedetektovan	*CeTLP1-like*
25	ostatak lista	29,502	*CeTLP1-like*
26	list rozete	34,853	*CeTLP1-like*
26	ostatak lista	35,986	*CeTLP1-like*
27	list rozete	36,814	*CeTLP1-like*
27	ostatak lista	32,328	*CeTLP1-like*
28	list rozete	34,591	*CeTLP1-like*
28	ostatak lista	35,296	*CeTLP1-like*
29	list rozete	31,339	*CeTLP1-like*
29	ostatak lista	34,945	*CeTLP1-like*
30	list rozete	35,923	*CeTLP1-like*
30	ostatak lista	33,380	*CeTLP1-like*
36	list rozete	Nedetektovan	*CeTLP1-like*
36	ostatak lista	35,434	*CeTLP1-like*
1	list rozete	34,871	*CeSERK1*
1	ostatak lista	32,267	*CeSERK1*
5	list rozete	32,380	*CeSERK1*
5	ostatak lista	35,061	*CeSERK1*
6	list rozete	33,317	*CeSERK1*
6	ostatak lista	32,904	*CeSERK1*
9	list rozete	32,874	*CeSERK1*
9	ostatak lista	34,412	*CeSERK1*
10	list rozete	33,499	*CeSERK1*
10	ostatak lista	28,991	*CeSERK1*

11	list rozete	32,202	*CeSERK1*
11	ostatak lista	36,434	*CeSERK1*
12	list rozete	Nedetektovan	*CeSERK1*
12	ostatak lista	34,394	*CeSERK1*
15	list rozete	31,932	*CeSERK1*
15	ostatak lista	Nedetektovan	*CeSERK1*
17	list rozete	Nedetektovan	*CeSERK1*
17	ostatak lista	35,041	*CeSERK1*
19	list rozete	33,498	*CeSERK1*
19	ostatak lista	30,400	*CeSERK1*
22	list rozete	31,277	*CeSERK1*
22	ostatak lista	Nedetektovan	*CeSERK1*
25	list rozete	34,065	*CeSERK1*
25	ostatak lista	25,671	*CeSERK1*
26	list rozete	31,506	*CeSERK1*
26	ostatak lista	34,683	*CeSERK1*
27	list rozete	32,581	*CeSERK1*
27	ostatak lista	33,268	*CeSERK1*
28	list rozete	31,746	*CeSERK1*
28	ostatak lista	34,083	*CeSERK1*
29	list rozete	29,300	*CeSERK1*
29	ostatak lista	33,351	*CeSERK1*
30	list rozete	33,204	*CeSERK1*
30	ostatak lista	32,310	*CeSERK1*
36	list rozete	35,913	*CeSERK1*
36	ostatak lista	32,917	*CeSERK1*
1	list rozete	Nedetektovan	*CeDC2.15-like*
1	ostatak lista	30,485	*CeDC2.15-like*
5	list rozete	Nedetektovan	*CeDC2.15-like*
5	ostatak lista	31,327	*CeDC2.15-like*
6	list rozete	35,530	*CeDC2.15-like*
6	ostatak lista	34,611	*CeDC2.15-like*
9	list rozete	35,266	*CeDC2.15-like*
9	ostatak lista	36,039	*CeDC2.15-like*
10	list rozete	Nedetektovan	*CeDC2.15-like*
10	ostatak lista	30,338	*CeDC2.15-like*
11	list rozete	33,358	*CeDC2.15-like*
11	ostatak lista	34,387	*CeDC2.15-like*
12	list rozete	35,801	*CeDC2.15-like*
12	ostatak lista	32,807	*CeDC2.15-like*
15	list rozete	32,167	*CeDC2.15-like*
15	ostatak lista	32,440	*CeDC2.15-like*
17	list rozete	Nedetektovan	*CeDC2.15-like*
17	ostatak lista	32,154	*CeDC2.15-like*
19	list rozete	34,427	*CeDC2.15-like*
19	ostatak lista	30,533	*CeDC2.15-like*

22	list rozete	35,456	*CeDC2.15-like*
22	ostatak lista	35,519	*CeDC2.15-like*
25	list rozete	Nedetektovan	*CeDC2.15-like*
25	ostatak lista	29,956	*CeDC2.15-like*
26	list rozete	Nedetektovan	*CeDC2.15-like*
26	ostatak lista	Nedetektovan	*CeDC2.15-like*
27	list rozete	34,253	*CeDC2.15-like*
27	ostatak lista	30,980	*CeDC2.15-like*
28	list rozete	34,414	*CeDC2.15-like*
28	ostatak lista	34,387	*CeDC2.15-like*
29	list rozete	32,195	*CeDC2.15-like*
29	ostatak lista	32,475	*CeDC2.15-like*
30	list rozete	Nedetektovan	*CeDC2.15-like*
30	ostatak lista	34,531	*CeDC2.15-like*
36	list rozete	Nedetektovan	*CeDC2.15-like*
36	ostatak lista	31,162	*CeDC2.15-like*
1	list rozete	34,242	*CePR10*
1	ostatak lista	19,893	*CePR10*
5	list rozete	32,106	*CePR10*
5	ostatak lista	23,250	*CePR10*
6	list rozete	33,454	*CePR10*
6	ostatak lista	24,985	*CePR10*
9	list rozete	33,725	*CePR10*
9	ostatak lista	24,815	*CePR10*
10	list rozete	34,179	*CePR10*
10	ostatak lista	22,364	*CePR10*
11	list rozete	32,212	*CePR10*
11	ostatak lista	26,043	*CePR10*
12	list rozete	34,390	*CePR10*
12	ostatak lista	21,012	*CePR10*
15	list rozete	25,965	*CePR10*
15	ostatak lista	24,107	*CePR10*
17	list rozete	22,880	*CePR10*
17	ostatak lista	22,241	*CePR10*
19	list rozete	Nedetektovan	*CePR10*
19	ostatak lista	25,971	*CePR10*
22	list rozete	Nedetektovan	*CePR10*
22	ostatak lista	23,896	*CePR10*
25	list rozete	35,370	*CePR10*
25	ostatak lista	30,764	*CePR10*
26	list rozete	Nedetektovan	*CePR10*
26	ostatak lista	28,916	*CePR10*
27	list rozete	32,422	*CePR10*
27	ostatak lista	20,365	*CePR10*
28	list rozete	27,773	*CePR10*
28	ostatak lista	29,673	*CePR10*

29	list rozete	39,350	*CePR10*
29	ostatak lista	22,459	*CePR10*
30	list rozete	33,921	*CePR10*
30	ostatak lista	26,373	*CePR10*
36	list rozete	23,265	*CePR10*
36	ostatak lista	20,610	*CePR10*
1	list rozete	32,553	*CePCC13-62-like*
1	ostatak lista	22,470	*CePCC13-62-like*
5	list rozete	Nedetektovan	*CePCC13-62-like*
5	ostatak lista	30,200	*CePCC13-62-like*
6	list rozete	31,072	*CePCC13-62-like*
6	ostatak lista	25,717	*CePCC13-62-like*
9	list rozete	31,967	*CePCC13-62-like*
9	ostatak lista	25,144	*CePCC13-62-like*
10	list rozete	35,317	*CePCC13-62-like*
10	ostatak lista	24,523	*CePCC13-62-like*
11	list rozete	30,886	*CePCC13-62-like*
11	ostatak lista	26,818	*CePCC13-62-like*
12	list rozete	33,499	*CePCC13-62-like*
12	ostatak lista	22,950	*CePCC13-62-like*
15	list rozete	23,942	*CePCC13-62-like*
15	ostatak lista	25,943	*CePCC13-62-like*
17	list rozete	22,821	*CePCC13-62-like*
17	ostatak lista	24,369	*CePCC13-62-like*
19	list rozete	32,089	*CePCC13-62-like*
19	ostatak lista	26,377	*CePCC13-62-like*
22	list rozete	38,287	*CePCC13-62-like*
22	ostatak lista	25,429	*CePCC13-62-like*
25	list rozete	33,066	*CePCC13-62-like*
25	ostatak lista	30,102	*CePCC13-62-like*
26	list rozete	Nedetektovan	*CePCC13-62-like*
26	ostatak lista	30,567	*CePCC13-62-like*
27	list rozete	30,666	*CePCC13-62-like*
27	ostatak lista	21,247	*CePCC13-62-like*
28	list rozete	27,469	*CePCC13-62-like*
28	ostatak lista	29,875	*CePCC13-62-like*
29	list rozete	Nedetektovan	*CePCC13-62-like*
29	ostatak lista	24,167	*CePCC13-62-like*
30	list rozete	31,627	*CePCC13-62-like*
30	ostatak lista	27,468	*CePCC13-62-like*
36	list rozete	22,162	*CePCC13-62-like*
36	ostatak lista	21,778	*CePCC13-62-like*
1	list rozete	Nedetektovan	*CeIAA32*
1	ostatak lista	25,563	*CeIAA32*
5	list rozete	28,924	*CeIAA32*
5	ostatak lista	32,168	*CeIAA32*

6	list rozete	Nedetektovan	*CeIAA32*
6	ostatak lista	24,325	*CeIAA32*
9	list rozete	32,449	*CeIAA32*
9	ostatak lista	29,012	*CeIAA32*
10	list rozete	35,945	*CeIAA32*
10	ostatak lista	26,983	*CeIAA32*
11	list rozete	Nedetektovan	*CeIAA32*
11	ostatak lista	26,071	*CeIAA32*
12	list rozete	Nedetektovan	*CeIAA32*
12	ostatak lista	29,239	*CeIAA32*
15	list rozete	Nedetektovan	*CeIAA32*
15	ostatak lista	29,381	*CeIAA32*
17	list rozete	Nedetektovan	*CeIAA32*
17	ostatak lista	28,559	*CeIAA32*
19	list rozete	34,352	*CeIAA32*
19	ostatak lista	29,362	*CeIAA32*
22	list rozete	35,802	*CeIAA32*
22	ostatak lista	25,973	*CeIAA32*
25	list rozete	34,508	*CeIAA32*
25	ostatak lista	36,117	*CeIAA32*
26	list rozete	Nedetektovan	*CeIAA32*
26	ostatak lista	27,946	*CeIAA32*
27	list rozete	32,314	*CeIAA32*
27	ostatak lista	25,429	*CeIAA32*
28	list rozete	Nedetektovan	*CeIAA32*
28	ostatak lista	24,279	*CeIAA32*
29	list rozete	Nedetektovan	*CeIAA32*
29	ostatak lista	26,257	*CeIAA32*
30	list rozete	36,142	*CeIAA32*
30	ostatak lista	25,994	*CeIAA32*
36	list rozete	Nedetektovan	*CeIAA32*
36	ostatak lista	24,762	*CeIAA32*
1	list rozete	Nedetektovan	*CeGRP3-like*
1	ostatak lista	27,540	*CeGRP3-like*
5	list rozete	Nedetektovan	*CeGRP3-like*
5	ostatak lista	35,731	*CeGRP3-like*
6	list rozete	33,058	*CeGRP3-like*
6	ostatak lista	30,473	*CeGRP3-like*
9	list rozete	Nedetektovan	*CeGRP3-like*
9	ostatak lista	31,196	*CeGRP3-like*
10	list rozete	Nedetektovan	*CeGRP3-like*
10	ostatak lista	28,763	*CeGRP3-like*
11	list rozete	33,673	*CeGRP3-like*
11	ostatak lista	29,356	*CeGRP3-like*
12	list rozete	Nedetektovan	*CeGRP3-like*
12	ostatak lista	28,998	*CeGRP3-like*

15	list rozete	27,822	*CeGRP3-like*
15	ostatak lista	30,375	*CeGRP3-like*
17	list rozete	31,471	*CeGRP3-like*
17	ostatak lista	29,655	*CeGRP3-like*
19	list rozete	35,913	*CeGRP3-like*
19	ostatak lista	26,279	*CeGRP3-like*
22	list rozete	34,901	*CeGRP3-like*
22	ostatak lista	30,416	*CeGRP3-like*
25	list rozete	35,072	*CeGRP3-like*
25	ostatak lista	29,221	*CeGRP3-like*
26	list rozete	35,270	*CeGRP3-like*
26	ostatak lista	32,060	*CeGRP3-like*
27	list rozete	33,077	*CeGRP3-like*
27	ostatak lista	28,289	*CeGRP3-like*
28	list rozete	32,623	*CeGRP3-like*
28	ostatak lista	Nedetektovan	*CeGRP3-like*
29	list rozete	34,156	*CeGRP3-like*
29	ostatak lista	28,581	*CeGRP3-like*
30	list rozete	33,233	*CeGRP3-like*
30	ostatak lista	29,907	*CeGRP3-like*
36	list rozete	28,958	*CeGRP3-like*
36	ostatak lista	29,461	*CeGRP3-like*
1	list rozete	37,446	*CeGH3.6*
1	ostatak lista	30,030	*CeGH3.6*
5	list rozete	33,635	*CeGH3.6*
5	ostatak lista	33,033	*CeGH3.6*
6	list rozete	31,975	*CeGH3.6*
6	ostatak lista	31,433	*CeGH3.6*
9	list rozete	33,004	*CeGH3.6*
9	ostatak lista	31,824	*CeGH3.6*
10	list rozete	Nedetektovan	*CeGH3.6*
10	ostatak lista	28,650	*CeGH3.6*
11	list rozete	32,455	*CeGH3.6*
11	ostatak lista	32,410	*CeGH3.6*
12	list rozete	35,746	*CeGH3.6*
12	ostatak lista	30,980	*CeGH3.6*
15	list rozete	31,178	*CeGH3.6*
15	ostatak lista	33,968	*CeGH3.6*
17	list rozete	Nedetektovan	*CeGH3.6*
17	ostatak lista	31,579	*CeGH3.6*
19	list rozete	33,489	*CeGH3.6*
19	ostatak lista	30,096	*CeGH3.6*
22	list rozete	30,505	*CeGH3.6*
22	ostatak lista	32,620	*CeGH3.6*
25	list rozete	Nedetektovan	*CeGH3.6*
25	ostatak lista	26,867	*CeGH3.6*

26	list rozete	31,450	*CeGH3.6*
26	ostatak lista	33,284	*CeGH3.6*
27	list rozete	31,291	*CeGH3.6*
27	ostatak lista	29,891	*CeGH3.6*
28	list rozete	30,280	*CeGH3.6*
28	ostatak lista	33,580	*CeGH3.6*
29	list rozete	29,550	*CeGH3.6*
29	ostatak lista	32,076	*CeGH3.6*
30	list rozete	32,791	*CeGH3.6*
30	ostatak lista	33,093	*CeGH3.6*
36	list rozete	35,930	*CeGH3.6*
36	ostatak lista	30,387	*CeGH3.6*

Biografija

Katarina B. Ćuković je rođena 24. maja 1991. godine u Jagodini, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Biološki fakultet na smeru Molekularna biologija i fiziologija upisala je 2010. godine, a diplomirala 2014. godine. Master studije rad na modulu Biotehnologija i genetički inženjering upisala je 2014. godine, a master rad pod nazivom „Uloga silicijuma u prevazilaženju stresa izazvanog deficitom gvožđa kod ječma (*Hordeum vulgare* L.)“ uradila je na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo i odbranila 2015. godine. Doktorske studije je upisala 2016. godine na modulu Fiziologija i molekularna biologija biljaka Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U periodu od 2017. do 2019. godine je bila zaposlena na Institutu za multidisciplinarna istraživanja, a od 2020. godine je zaposlena kao istraživač saradnik na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju.

Katarina je u periodu od 2017. do 2022. godine bila angažovana na međunarodnom projektu „*Chicory as a multipurpose crop for dietary fibre and medicinal terpenes*“ (akronim *CHIC*, broj 760891) u okviru Horizont 2020 programa. Osim toga, učestvovala je na bilateralnom projektu između Republike Srbije i Hrvatske pod nazivom „*Exploring a regulatory role of TROL protein in electron partitioning in UVB-induced mechanism of flavonoid and anthocyanins accumulation in Arabidopsis leaf*“ (2019-2020), kao i na projektu finansiranom od strane *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology*, *ICGEB* (*Collaborative Research Program Grant* CRP/HRV20-03) pod nazivom „*Redox-sensing and electron transfer at the inner envelope of chloroplasts – the role of the TROL-FNR interaction*“ (2021-2023). Katarina je do sada objavila pet naučnih publikacija i 14 kongresnih saopštenja. Katarina je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije.