

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Maja M. Belić

**SINERGISTIČKI UTICAJ GIBERELINA I
SVETLOSTI NA INDUKCIJU SOMATSKE
EMBRIOGENEZE IZ LATERALNIH
KORENOVA SPANAČA (*Spinacia oleracea* L.) *in
vitro***

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Maja M. Belić

**SYNERGISTIC EFFECT OF GIBBERELLIN
AND LIGHT ON THE INDUCTION OF SOMATIC
EMBRYOGENESIS FROM LATERAL ROOTS
OF SPINACH (*Spinacia oleracea* L.) *in vitro***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Mentori:

Naučni saradnik dr Jelena Milojević
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Vanredni profesor dr Dušica Janošević
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Članovi komisije:

Naučni savetnik dr Snežana Zdravković-Korać
Univerzitet u Beogradu
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Vanredni profesor dr Tijana Cvetić-Antić
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Naučni saradnik dr Suzana Pavlović
Institut za povrtarstvo
Smederevska Palanka

Datum odbrane:

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

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Jeleni Milojević, koja je uvek bila nepresušni izvor davanja. Bez njene posvećenosti, zalaganja, znanja i iskustva ove doktorske disertacije ne bi ni bilo.

Veliko hvala dr Dušici Janošević na stručnoj pomoći i korisnim savetima u oblikovanju teze i realizaciji histoloških eksperimenata.

Želim od srca da se zahvalim dr Snežani Zdravković-Korać na pruženoj ogromnoj podršci i nesebičnim savetima tokom koncipiranja, realizacije eksperimenata i pisanja teze. Njena ogromna posvećenost je učinila da ovo nezaboravno putovanje zvano doktorat prođe lakše i lepše.

Dr Tijani Cvetić Antić se zahvaljujem na velikoj pomoći i savetima tokom doktorskih studija i pregledu teze.

Srdačno se zahvaljujem dr Suzani Pavlović na uloženom velikom trudu u pregledu teze, korisnim savetima i na lepoj i uspešnoj saradnji koju ostvarujemo godinama.

Veliku zahvalnost dugujem dr Branki Vinterhalter na ukazanoj prilici i poverenju da budem deo njenog tima koji se bavi inžvanrednim istrživanjama.

Istraživanja koja se odnose na analizu sadržaja endogenih gibberelina su urađena pod rukovodstvom Dr Danuše Tarkowská na Institutu za eksperimentalnu botaniku Češke akademije nauka, Univerzitet Palacký, Olomouc, i ovom joj se prilikom posebno zahvaljujem.

Dr Draganu Vinterhalteru i dr Suzani Živković veliko hvala na stručnim savetima i pomoći oko realizacije pojedinih eksperimenata.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj dragoj kolegici i cimerki dr Branki Uzelac na prevodenju stučnih tekstova, kao i na ogromnoj podršci i korisnim savetima koji su imali neprocenljivu vrednost za izradu ove teze.

Zahvalnost dugujem i svim svojim kolegama Odeljenja za Fiziologiju biljaka na kolegijalnosti i prijatnoj radnoj atmosferi.

Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Rebulike Srbije se zahvaljujem na stipendiranju tokom doktorskih studija i obezbeđivanju finansija za kupovinu hemikalija neophodnih za izradu eksperimentalnog dela ove teze.

Žarku Milojeviću dugujem ogromnu zahvalnost za statističku obradu podataka i korisnim sugestijama za prikazivanje rezultata.

Veliko hvala mom dragom kumu, Aleksandru Vuksanoviću, za pomoć oko grafičkog prikazivanja rezultata, ali i za nesebičnu podršku koja nikada nije izostala.

Mojim dragim prijateljicama Jeleni Barišić i Mariji Čosić koje su uvek bile tu za mene i pomagale mi da prevaziđem sve prepreke, neizmerno hvala.

Beskrajnu zahvalnost dugujem Stefanu. Zahvaljujući njemu uvek sam se osećala snažnom i činila smeće korake, jer sam znala da je uvek iza mene i da nikada i ni u čemu nisam sama.

Hvala mojoj najdražoj porodici. Nemoguće je vratiti sve ono što sam od njih dobila kroz život, ali volela bih budu ponosni na mene uvek, da znaju da je svako davanje urodilo plodom. Njima je ova teza i posvećena.

Sinergistički uticaj giberelina i svetlosti na indukciju somatske embriogeneze iz lateralnih korenova spanaća (*Spinacia oleracea* L.) *in vitro*

SAŽETAK

U ovom radu analiziran je uticaj giberelina (GA) i svetlosti na indukciju somatske embriogeneze iz apikalnih odsečaka korenova spanaća sorte „Matador“. Izolovani organi kultivisani su u uslovima *in vitro* na medijumu za indukciju somatske embriogeneze, koji je sadržao 20 μM α -naftil-sirćetnu kiselinu (NAA) i 5 μM giberelnu kiselinu (GA_3).

Velika varijabilnost u embriogenom potencijalu spanaća, koja je posebno izražena kod sorte „Matador“, otežava proučavanje delovanja drugih faktora na proces somatske embriogeneze. Analizom embriogenog potencijala nasumično izabranih klijanaca dobijenih isključivanjem semena sorte „Matador“ devet različitih evropskih proizvođača semena, uočeno je značajno variranje frekvence regeneracije (0-100%) između populacija i individua u okviru populacije, kao i prosečnog broja somatskih embriona (SE) po eksplantatu (0-14.4 po populaciji, odnosno 0-36 po eksplantatu pojedinačnih klijanaca). Rezultati ukazuju na važnost odabira biljnog materijala za eksperiment, jer on može značajno uticati na interpretaciju rezultata. Stoga je u ovom radu razvijena i uspešno korišćena metoda uzorkovanja biljnog materijala, izlaganjem jednakog broja odsečaka korenova svakog klijanca svim tretmanima u okviru eksperimenta, čime je prevaziđen uticaj varijabilnosti biljnog materijala usled genetičkih i drugih uticaja.

U cilju ispitivanja mehanizma kojim GA_3 indukuje proces somatske embriogeneze, testiran je uticaj paklobutrazola (PAC), inhibitora biosinteze GA i trihostatina A (TSA), inhibitora deacetilaze histona, na ovaj proces. Suprotno očekivanju, PAC je delovao sinergistički sa GA_3 i NAA u stimulaciji somatske embriogeneze. U kombinaciji sa NAA+ GA_3 , 1–10 μM PAC je uticao na povećanje embriogenog potencijala, sa najvećim efektom pri 2.5 μM PAC. U kombinaciji sa NAA, koji sam po sebi nije dovoljan za indukciju somatske embriogeneze, bila je potrebna nešto viša koncentracija PAC za dostizanje značajnog embriogenog odgovora—10 μM PAC za eksplantate nasumično izabranih klijanaca i 5 μM PAC za eksplantate genetički predisponiranih jedinki prema procesu somatske embriogeneze. TSA (0.1–5 μM primenjen u trajanju od 1, 7 ili 14 dana) nije mogao da zameni ni NAA ni GA_3 u indukciji somatske embriogeneze, ali je u kombinaciji sa 10 μM NAA+5 μM GA_3 ili 20 μM NAA+5 μM GA_3 uticao na značajno povećanje embriogenog potencijala eksplantata. Pozitivan uticaj TSA na indukciju somatske embriogeneze je pre svega zavisio od dužine trajanja tretmana. Duži TSA treatment je bio potreban u kombinaciji sa nižom koncentracijom NAA i obrnuto. Uočen je i značajan uticaj dimetil sulfoksida, koji je korišćen kao rastvarač TSA, na povećanje embriogenog potencijala eksplantata.

Kvalitet svetlosti je takođe značajno uticao na embriogeni potencijal eksplantata. Najveći embriogeni potencijal su imali eksplantati kultivisani pod plavom LED svetlošću. Eksplantati kultivisani pod belom LED i fluorescentnom svetlošću su imali značajno niži embriogeni potencijal, dok je regeneracija somatskih embriona bila potpuno inhibirana u eksplantatima kultivisanim pod crvenom LED svetlošću ili u mraku.

Da bi se rasvetlio mehanizam delovanja GA i svetlosti na indukciju procesa somatske embriogeneze, sprovedena je detaljna analiza metabolizma GA u eksplantatima tokom indukcije somatske embriogeneze analizom ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za biosintezu (*SoGA20-ox1* i *SoGA3-ox1*) i inaktivaciju (*SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3*) GA, kao i sadržaja endogenih GA. Najveće razlike između embriogenih eksplantata (kultivisanih na medijumu sa NAA+ GA_3), i neembriogenih eksplantata (kultivisanih na medijumu bez biljnih regulatora rastjenja i razvića ili na medijumu sa GA_3 ili NAA) su detektovane u ekspresiji *SoGA20-ox1* i *SoGA2-ox2* gena. U

neembriogenim eksplantatima, ekspresija *SoGA20-ox1* je bila niža u odnosu na kontrolu (korenove intaktnih klijanaca) tokom 1 do 14 dana, dok je u embriogenim eksplantatima ekspresija ovog gena tokom celokupnog perioda indukcije SE bila značajno niža u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, ekspresija *SoGA2-ox2* je bila značajno veća u embriogenim nego u neembriogenim eksplantatima. Profil ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam GA je bio sličan u eksplantatima kultivisanim na medijumu sa NAA+PAC, NAA+GA₃ i NAA+GA₃+PAC. Slično tome, nisu uočene značajne razlike u ekspresiji navedenih gena u eksplantatima kultivisanim pod fluorescentnom, plavom ili belom LED svetlošću. Navedeno ukazuje da PAC i kvalitet svetlosti stimulišu somatsku embriogenezu kod spanaća nekim drugim mehanizmom koji ne podrazumeva promene na nivou ekspresije gena uključenih u metabolizam GA.

U neembriogenim eksplantatima, kultivisanim na medijumu sa 20 μM NAA, detektovan je samo kratkotrajan skok endogene GA₃, bez značajnog povećanja koncentracije ostalih bioaktivnih GA. Nasuprot tome, u embriogenim eksplantatima, kultivisanim na medijumu sa 20 μM NAA+5 μM GA₃, je detektovan značajno veći i dugotrajniji skok GA₃, koji se reflektovao uticajem na značajno povećanje nivoa većine endogenih bioaktivnih GA (GA₁, GA₄ i GA₇). Rezultati ukazuju da je drastično povećanje koncentracije bioaktivnih GA u eksplantatima u korelaciji sa indukcijom somatske embriogeneze kod spanaća.

Ključne reči: Dimetil-sulfoksid, ekspresija gena, genotip, giberelini, LED svetlost, paklobutrazol, *Spinacia oleracea*, somatska embriogeneza, svetlost, trihostatin.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka

Synergistic effect of gibberellin and light on the induction of somatic embryogenesis from lateral roots of spinach (*Spinacia oleracea* L.) *in vitro*

ABSTRACT

In this work, the impact of gibberellins (GA) and light, on somatic embryo initiation *in vitro* from root apices of spinach seedlings (cv. Matador) was studied. The explants were cultivated on induction medium supplemented with 20 μ M α -naphthaleneacetic acid (NAA) and 5 μ M gibberellic acid (GA₃).

A high variability in embryogenic capacity of spinach, especially in the cultivar "Matador", impedes studying the effects of other factors on the induction of somatic embryogenesis. Analysis of embryogenic potential of randomly chosen seedlings, obtained from seeds of cv. "Matador" purchased from nine European seed companies, showed significant variation in the regeneration frequency (0-100%) among populations and individuals within the population, as well as in the mean SE number per explant (0-14.4 and 0-36 per population and per individual seedlings' explants, respectively). The results strongly evidenced the importance of the sampling of plant material, because it may significantly affect the interpretation of the data. With the aim to overcome such high variability of plant material due to genetic and other impacts, a sampling method was developed and successfully applied in the present work. The sampling method implies the exposure of equal number of root explants taken from each seedling to all treatments.

In order to investigate the mechanism of GA₃ action on somatic embryogenesis induction, the influence of paclobutrazole (PAC), an inhibitor of GA biosynthesis, and trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, on this process was studied. Unexpectedly, PAC acted synergistically with GA₃ and NAA in promoting somatic embryogenesis. In combination with NAA+GA₃, 1–10 μ M PAC increased embryogenic capacity of the explants, with maximum effect at 2.5 μ M PAC. In combination with NAA, which alone is not sufficient to induce somatic embryogenesis, higher concentrations of PAC were required for satisfactory embryogenic response—10 μ M PAC for the explants taken from randomly chosen seedlings and 5 μ M PAC for the explants derived from the seedlings genetically predisposed for somatic embryogenesis.

TSA (0.1–5 μ M applied over 1, 7 or 14 days) could not substitute for either NAA or GA₃ in somatic embryogenesis induction, although it significantly increased embryogenic capacity of the explants in combination with 10 μ M NAA+5 μ M GA₃ or 20 μ M NAA+5 μ M GA₃. The positive impact of TSA on somatic embryogenesis induction mostly depended on the treatment duration. Longer TSA treatments were required with lower level of NAA and vice versa. In addition, a significant positive impact of dimethyl sulfoxide, used to dissolve TSA, on embryogenic capacity of the explants was observed.

The quality of the light also significantly affected the embryogenic potential of the explants. Explants cultured under blue LED light exhibited the highest embryogenic potential. Explants cultured under white LED and fluorescent light had significantly lower embryogenic potential, while somatic embryo regeneration was completely inhibited in explants cultured under red LED light or in the dark.

To elucidate the mechanism of action of GA and light on somatic embryogenesis induction, a detailed analysis of GA metabolism in the explants during induction of somatic embryogenesis was performed by analyzing the expression of genes encoding key enzymes in GA biosynthesis (SoGA20-ox1 and SoGA3-ox1) and inactivation (SoGA2-ox1, SoGA2-ox2 and SoGA2-ox3), as well as the

endogenous GA content. The most dramatic differences between embryogenic explants (cultured on medium with NAA+GA₃), and non-embryogenic explants (cultured on medium without plant growth regulators or on medium with GA₃ or NAA) were detected in the expression of *SoGA20-ox1* and *SoGA2-ox2* genes. In the non-embryogenic explants, the *SoGA20-ox1* expression was lower during 1-14 days compared to the control (roots of intact seedlings), while in the embryogenic explants the expression of this gene was significantly lower than the control during the entire period of SE induction. In contrast, the expression of *SoGA2-ox2* was significantly higher in the embryogenic than in non-embryogenic explants. The expression profile of the genes encoding key enzymes of GA metabolism was similar in the explants cultured on medium supplemented with NAA+PAC, NAA+GA₃ and NAA+GA₃+PAC. Similarly, no significant differences in the expression of these genes were observed in the explants cultured under fluorescent, blue or white LED light. This indicates that PAC and light quality enhance somatic embryogenesis in spinach by some other mechanism that does not include alterations in the expression level of genes encoding the key enzymes involved in GA metabolism.

In the non-embryogenic explants, cultured on 20 μM NAA-supplemented medium, only a transient increase in endogenous GA₃ was detected, without significant alterations in the levels of other bioactive GAs. By contrast, in the embryogenic explants, cultured on medium supplemented with 20 μM NAA+5 μM GA₃, a significantly higher and longer-lasting increase in GA₃ was detected, followed by a significant increase in the levels of the majority of endogenous bioactive GAs (GA₁, GA₄ and GA₇). The obtained results evidence that the drastic increase in the levels of bioactive GAs in the explants correlated with the induction of somatic embryogenesis in spinach.

Key words: Dimethyl sulfoxide, endogenous GA content, genotype, gene expression, gibberellins, light, LED (Light emitting diodes), paclobutrazol, somatic embryogenesis, *Spinacia oleracea*.

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Plant physiology

SADRŽAJ

SKRAĆENICE

1. UVOD.....	1
1.1. Morfogeneza biljaka u uslovima <i>in vitro</i>	1
1.1.1. Procesi regeneracije <i>in vitro</i>	1
1.1.2. Somatska embriogeneza	2
1.1.2.1. Mehanizam indukcije somatske embriogeneze.....	4
1.1.2.2. Molekularni mehanizmi indukcije somatske embriogeneze	4
1.1.2.3. Molekularni markeri specifični za somatsku embriogenezu.....	9
1.1.2.4. Faktori koji utiču na somatsku embriogenezu	11
1.2. Giberelini	19
1.2.1. Biosinteza i metabolizam GA	20
1.2.2. Inhibitori biosinteze GA	23
1.2.3. Molekularni mehanizmi delovanja inhibitora biosinteze GA.....	26
1.2.4. Signalni put GA	27
1.2.5. Povratna sprega kao kontrola dinamike sinteze giberelina.....	29
1.2.6. Percepcija svetlosti	30
1.2.7. Uticaj svetlosti na biosintezu giberelina	31
1.2.8. Uticaj svetlosti na biosintezu, signalni put i transport auksina.....	33
1.2.9. Interakcija giberelina sa drugim fitohormonima	34
1.3. Spanać.....	36
1.3.1. Morfogeneza spanaća u uslovima <i>in vitro</i>	37
1.3.2. Molekularni markeri za praćenje somatske embriogeneze spanaća	40
2. CILJEVI.....	41
3. MATERIJAL I METODE.....	43
3.1. Biljni materijal i uslovi gajenja kultura	43
3.1.1. Biljni materijal	43
3.1.2. Sterilizacija semena spanaća.....	43
3.1.3. Bazalni medijum za gajenje spanaća	43
3.1.4. Uslovi gajenja <i>in vitro</i> kultura spanaća.....	43

3.2.	Indukcija somatske embriogeneze.....	43
3.3.	Histološka analiza.....	44
3.4.	Faktori koji utiču na somatsku embriogenezu iz apikalnih odsečaka korenova spanaća.....	44
3.4.1.	Genotip.....	44
3.4.2.	Testiranje metoda uzorkovanja biljnog materijala.....	46
3.4.3.	Inhibitori biosinteze giberelina	46
3.4.4.	Trihostatin	46
3.4.5.	Svetlost.....	47
3.5.	Statistička analiza podataka.....	48
3.6.	Analiza ekspresije gena	48
3.6.1.	Izolacija RNK	48
3.6.2.	Određivanje kvaliteta i kvantiteta RNK.....	49
3.6.3.	Reverzna transkripcija RNK molekula	50
3.6.4.	Određivanje nivoa ekspresije gena metodom kvantitativnog RT-PCR	50
3.6.5.	Ispitivanje metode uzorkovanja biljnog materijala.....	52
3.6.6.	Analiza ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina u eksplantatima tokom indukcije somatske embriogeneze	52
3.6.7.	Uticaj paklobutrazola na ekspresiju gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina u izolovanim odsečcima korenova spanaća.....	54
3.6.8.	Uticaj svetlosti na ekspresija gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina u eksplantatima	54
3.7.	Statistička analiza podataka dobijenih ispitivanjem ekspresije gena	54
3.8.	Analiza sadržaja endogenih giberelina	54
3.8.1.	Ekstrakcija i prečišćavanje giberelina.....	55
3.8.2.	Kvantifikacija endogenih giberelina.....	55
3.8.3.	Statistička analiza podataka dobijenih analizom sadržaja endogenih giberelina... ..	56
4.	REZULTATI.....	57
4.1.	Biljni materijal.....	57
4.2.	Faktori koji utiču na somatsku embriogenezu iz apikalnih odsečaka korenova spanaća.....	57
4.1.1.	Genotip.....	57
4.1.2.	Histološka analiza	64
4.1.3.	Ispitivanje metode uzorkovanja biljnog materijala praćenjem ekspresije <i>SoRIP2</i> gena.....	65
4.1.4.	Inhibitori biosinteze giberelina	67

4.1.5. Trihostatin.....	71
4.1.6. Svetlost.....	82
4.3. Analiza ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina u eksplantatima tokom indukcije somatske embriogeneze.....	84
4.4. Uticaj paklobutrazola na ekspresija gena za metabolizam giberelina u izolovanim odsećcima korenova spanaća.....	90
4.5. Uticaj svetlosti na ekspresija gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina u eksplantatima.....	95
4.6. Analiza endogenih giberelina.....	103
5. DISKUSIJA.....	108
5.1. Biljni materijal.....	108
5.2. Varijabilnost embriogenog potencijala na nivou populacija i individua.....	108
5.3. Histološka analiza.....	110
5.4. Testiranje metode uzorkovanja biljnog materijala.....	111
5.5. Uticaj paklobutrazola na embriogeni potencijal eksplantata.....	112
5.6. Uticaj trihostatina na embriogeni potencijal eksplantata.....	113
5.7. Uticaj svetlosti na embriogeni potencijal eksplantata.....	116
5.8. Ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina u eksplantatima tokom indukcije somatske embriogeneze.....	117
5.9. Uticaj paklobutrazola na ekspresija gena za metabolizam giberelina u izolovanim odsećcima korenova spanaća.....	121
5.10. Uticaj svetlosti na ekspresija gena za metabolizam giberelina u izolovanim odsećcima korenova spanaća.....	123
5.11. Analiza endogenih giberelina.....	124
6. ZAKLJUČCI.....	130
7. LITERATURA.....	133
BIOGRAFIJA AUTORA.....	192

Prilog 1 – Izjava o autorstvu

Prilog 2 – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije

Prilog 3 – Izjava o korišćenju

Skraćenice

ABA	Apscisinska kiselina
ABI 3	eng. <i>ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3</i>
AGL15	eng. <i>AGAMOUS LIKE 15</i>
ANOVA	Analiza varijanse
APX	Askorbat peroksidaza
ARR	eng. <i>ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR</i>
ATP	Adenozin trifosfat
AUX1/LAX	eng. <i>AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1</i>
B	Plava svetlost
BAP	N ⁶ -benzilaminopurin
BBM	eng. BABYBOOM
BM	Bazalni medijum
BZR1	eng. <i>BRASSINAZOLE RESISTANT 1</i>
CAT	Katalaza
CDK	eng. <i>CYCLIN-DEPENDENT KINASE</i>
cDNK	Komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina
CKX	Citokinin oksidaza/dehidrogenaza
CLV1	eng. <i>CLAVATA1</i>
COP1	eng. <i>CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1</i>
CPS	<i>ent</i> -kopalil difosfat sintaza
CRD	eng. <i>Completely Randomized Design</i>
CRY	Kriptohrom
CTAB	Cetiltrimetilamonijum
2,4-D	2,4-dihlorfenoksi sirćetna kiselina
DD	Dugi dan (16h svetlosti)
DAG1	eng. <i>DOF AFFECTING GERMINATION 1</i>
DEPC	Dietilpirokarbonat
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
dNTP	2'-dezoksi-nukleozid-5'-trifosfat
DTT	Ditiotreitol
EP	Embriogeni potencijal
Fl	Fluorescentna svetlost
Fe-EDTA	Fe-etilendiamintetrasirćetna kiselina
FR	Tamnocrvena svetlost
FUS3	eng. <i>FUSCA 3</i>
GA	Giberelin
GA20-ox	Giberelin-20-oksidaza
GA3-ox	Giberelin-3-oksidaza
GA2-ox	Giberelin-2-oksidaza
GGPP	Geranilgeranil-pirofosfat

GH3	eng. <i>Greatchen Hagen 3</i>
GID1	eng. <i>GA INSENSITIVE DWARF 1</i>
GLP	eng. <i>GERMIN-LIKE PROTEIN</i>
GST	Glutation-S-transferaza
HY5	eng. <i>LONG HYPOCOTYL 5</i>
IAA	Indol-3-sirćetna kiselina
IMSE	Medijumu za indukciju somatske embriogeneze
iRNK	Informaciona ribonukleinska kiselina
KAO	Oksidaza <i>ent</i> -kaurenoične kiseline
KD	Kratak dan (8h svetlosti)
KIN, kinetin	6-furfurilaminopurin
KO	<i>ent</i> -kauren oksidaza
KS	sintaza <i>ent</i> -kaurena
LED	eng. <i>Light Emitting Diode</i>
L1L	eng. <i>LEAFY COTYLEDON-LIKE</i>
LEC	eng. <i>LEAFY COTYLEDON</i>
LRR-RLK	eng. <i>LEUCINE-RICH REPEAT RECEPTOR-LIKE KINASE</i>
MES	2-(N-morfolino) etansulfonska kiselina
miRNK	Mikro ribonukleinska kiselina
MYB118	eng. <i>MYELOBLASTOSIS 118</i>
NAA	α -naftil-sirćetna kiselina
PAC	Paklobutrazol
pCPA	<i>para</i> -hlorfenoksisirćetna kiselina
PGP	P-glukoproteina
PHYA	Fitohrom A
PHYB	Fitohrom B
PHYD	Fitohrom D
PIF	eng. <i>PHITOCHROME INTERACTING FACTOR</i>
PIN	eng. <i>PIN-FORMED</i>
PKL	eng. <i>PICKLE</i>
POD	Peroksidaza
PPFD	Gustina fluksa fotona (eng. Photosynthetic Photon Flux Density)
PRC1	eng. <i>Repressive Complex 1</i>
PRC2	eng. <i>Repressive Complex 2</i>
PVP	Polivinilpirolidon
QTL	eng. <i>Quantitative Trait Loci</i>
RAM	Apikalni meristem korena (eng. Root Apical Meristem)
PIL5	eng. <i>PHYTOCHROME-INTERACTING PROTEIN 5</i>
RIP	Ribozom inaktivirajući proteini
R	Crvena svetlost
RNK	Ribonukleinska kiselina
ROS	Reaktivne kiseonične vrste (eng. Reactive Oxygen Species)

rRNK	Ribozomalna ribonukleinska kiselina
SAM	Apikalni meristem izdanka (eng. Shoot Apical Meristem)
SERK	eng. <i>SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE</i>
SGR2	eng. <i>STAY-GREEN2</i>
SLY1	eng. <i>SLEEPY1</i>
SK1	eng. <i>STRESS KINASE 1</i>
SPY	eng. <i>SPINDLY</i>
SOD	Superoksid dismutaza
SOM	eng. <i>SOMUNUS</i>
STM	eng. <i>SHOOTMERISTEMLESS</i>
SUR2	eng. <i>SUPERROOT 2</i>
TAA1	eng. <i>TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE</i>
TCL	Tankoslojni ćelijski preseki (eng. Thin Cell Layers)
TSA	Trihostatin A
VAL1/VAL2	eng. <i>VIVIPAROUS ABI3-LIKE</i>
W	Bela svetlost
WOX	eng. <i>WUSCHEL-related homeobox</i>
w/v	Težina po zapremini (eng. weight/volumen)
WUS	eng. <i>WUSCHEL</i>
YUC	eng. <i>YUCCA FLAVIN MONOOXIGENASE</i>
ZEA, zeatin	6-(4-hidroksi-3-metil-but-trans-2-enilamino) purin

1. UVOD

1.1. Morfogeneza biljaka u uslovima *in vitro*

Biljke poseduju izuzetnu plastičnost u razviću, jer kao sesilni organizmi, one su morale tokom evolucije da razviju niz strategija koje će im omogućiti preživljavanje u promenljivim uslovima spoljašnje sredine. Najizraženija strategija je neuporediva sposobnost regeneracije koje biljke poseduju. Za razliku od životinja, biljne ćelije imaju sposobnost da regenerišu ne samo pojedinačna tkiva i organe, već i ceo biljni organizam. Ova sposobnost biljaka poznata je već decenijama i naziva se totipotencija. Koncept ćelijske totipotencije je prvi uveo Haberlandt 1902. godine i ukazao da diferencirane biljne ćelije, sve dok sadrže kompletan broj hromozoma, mogu biti sposobne za regeneraciju kompletnih biljaka (Haberlandt, 1902). Upravo na ovom konceptu se zasnivaju gotovo svi putevi regeneracije kod biljaka.

Morfogeneza *in vitro* predstavlja regeneraciju organa ili celog biljnog organizma iz organa majke-biljke. Proces morfogeneze se može podeliti na tri faze: 1) sticanje kompetencije ćelija za regeneraciju, 2) determinaciju ćelija za formiranje specifičnog obrasca razvića i 3) diferencijaciju ćelija (Christianson & Warnick, 1983). Biljne ćelije nisu same po sebi totipotentne, ali mogu da postanu pod uticajem različitih stimulusa (Fehér, 2019). Sticanje kompetencije ćelija se ogleda u njihovoj sposobnosti da prepoznaju specifične signale koji dovode do prelaska na embrionalni obrazac razvića. Nakon toga, ćelije ulaze u stanje diferencijacije, uspostavljajući novu organizaciju tkiva. Procesi regeneracije u uslovima *in vitro* imaju veliku praktičnu primenu, a pre svega pružaju nove mogućnosti za razvoj biotehnologije i genetičkog inženjerstva.

1.1.1. Procesi regeneracije *in vitro*

U zavisnosti od tipa organa koji nastaju regeneracijom, razlikuju se dva osnovna procesa regeneracije *in vitro* – organogeneza i somatska embriogeneza. U kom smeru će se odvijati regeneracija zavisi od mnogih faktora, ali pre svega od tipa i odnosa biljnih regulatora rastjenja (BRR, Skoog & Miller, 1957). Organogeneza podrazumeva *de novo* obrazovanje pupoljaka (kaulogeneza) i korenova (rizogeneza). Pre više od pola veka su Skoog & Miller (1957) uočili da odgovarajući odnos između dva hormona, citokinina i auksina, može da odredi put organogeneze. Pa tako, visoka koncentracija auksina indukuje rizogenezu, a visoka koncentracija citokinina kaulogenezu, dok u približnom odnosu dovode do formiranja kalusa. Za razliku od toga, u procesu somatske embriogeneze dolazi do regeneracije embriona iz jedne ili više somatskih ćelija, koji se zatim razvijaju u kompletne biljke. Zapanjujući regenerativni potencijal somatskih ćelija su prvi put uočili Steward *et al.* (1958) i Reinert (1958) u suspenziji ćelija *Daucus carota L.*

Somatska embriogeneza predstavlja najpoželjniji proces regeneracije biljaka u uslovima *in vitro*, jer somatski embrioni imaju formirane apikalne meristeme izdanka i korena, te nije potrebna dodatna faza ožiljavanja, kao pri procesu kaulogeneze (Von Arnold *et al.*, 2002). Regeneracija biljaka putem somatske embriogeneze predstavlja izuzetan sistem vegetativnog razmnožavanja, koji može obezbediti izuzetno veliki broj propagula (Schavemaker & Jacobsen, 1995). Takođe, somatski embrioni su najčešće korišćeni početni eksplantati za genetičku transformaciju, te se ovim putem mogu dobiti regenerisane transformisane biljke (Debeaujon & Branchard, 1993). Upravo je to najčešći razlog zbog koga je ova pojava aktuelna u kulturi *in vitro*.

Osim somatske embriogeneze, kod biljaka se mogu indukovati još dva procesa embrionalnog razvića - androgeneza i ginogeneza. Ova dva procesa se razlikuju od somatske embriogeneze, jer se razviće embriona ne odvija iz somatskih ćelija, već iz ćelija mikrospora (androgeneza) i makrospora (ginogeneza) (Shariatpanahi *et al.*, 2006; Bohanec, 2009; Seguí-Simarro, 2010). Na ovaj način se dobijaju haploidne biljke, koje imaju veliku praktičnu primenu u proizvodnji dihaploidnih, odnosno čistih homozigotnih linija (Murovec & Bohanec, 2012; Niazian & Shariatpanahi, 2020). Osim toga, korisne su za studiranje totipotencije (Powell, 1990) i predstavljaju dobar sistem za proučavanje indukovane mutogeneze (Seguí-Simarro & Nuez, 2008).

1.1.2. Somatska embriogeneza

Somatska embriogeneza predstavlja prelazak somatskih ćelija iz vegetativne na embrionalnu fazu razvića, koji ne uključuje formiranje gameta i njihovo oplodjenje (von Arnold *et al.*, 2002; Jha *et al.*, 2020). Biljne ćelije imaju sposobnost da se dediferenciraju, nakon čega podležu deobama, neke od njih se diferenciraju u somatske embrione iz kojih se mogu formirati kompletne biljke. Iako se ova pojava u prirodi dešava relativno retko i to najčešće na ovulama (*Paeonia*) (Koltunow & Grossniklaus, 2003) ili na listovima (*Asplenium* ili *Kalanchoe*) (Yarborough, 1932), u uslovima *in vitro* somatska embriogeneza je uočena kod velikog broja biljnih vrsta.

Regeneracija biljaka putem somatske embriogeneze se može podeliti u dve glavne faze: fazu indukcije i fazu razvića somatskih embriona. Tokom faze indukcije pod uticajem različitih faktora dolazi do proliferacije i dediferencijacije somatskih ćelija usled čega one postaju kompetentne za formiranje somatskih embriona, dok u fazi razvića embrionalne ćelije se diferenciraju u somatske embrione (Luo & Koop, 1997).

Somatski embrioni mogu nastati iz jedne ili više somatskih ćelija, što najčešće zavisi od kordinisanog ponašanja ćelija koje ih okružuju (Williams & Maheswaran, 1986). Kada embrioni imaju jednoćelijsko poreklo, dolazi do kordinisanih ćelijskih deoba i embrioni nisu povezani sa tkivom majke ili su povezani preko strukture slične suspenzoru (Williams & Maheswaran, 1986). Međutim, embrioni sa višecelijskim poreklom nemaju koordinisane ćelijske deobe i svojim bazalnim delom su povezani sa tkivom majke (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

Somatski embrioni se mogu razviti direktno iz eksplantata bez kalusne faze ili indirektno iz kalusa (Williams & Maheswaran, 1986). Direktna somatska embriogeneza se dešava u ćelijama koje poseduju prethodno determinisani embriogeni potencijal i koje se javljaju uglavnom u embrionalnim tkivima (Williams & Maheswaran, 1986). Zbog toga se direktna somatska embriogeneza najefikasnije indukuje iz nezrelih zigotskih embriona i organa klijanca (Germanà, 2003; Gaj *et al.*, 2005; Malik *et al.*, 2007; Pavlović *et al.*, 2013). Neke ćelije ovih eksplantata se razvijaju u somatske embrione spontano, bez potrebnih spoljašnjih stimulusa. Karakteristična pojava u direktnoj somatskoj embriogenezi je da se na primarnom embrionu razvija veći broj sekundarnih, što se ponavlja u svakoj subkulturi. Ova pojava se naziva sekundarna, rekurentna ili repetitivna somatska embriogeneza, koja je vrlo korisna za klonalno razmnožavanje i proizvodnju velikog broja embriona (Thomas *et al.*, 1976). U indirektnoj somatskoj embriogenezi učestvuju ćelije koje su diferencirane i nemaju embriogeni potencijal. One ne mogu spontano da se razvijaju u somatske embrione, već im je potrebna određena doza BRR. Bez obzira kojim putem nastaju, somatski embrioni su morfološki veoma slični. Do značajnog reprogramiranja ekspresije gena dolazi tokom indirektno somatske embriogeneze što je neophodno za sticanje ćelijske kompetencije (Willemsen & Scheres, 2004; Miguel & Marum, 2011). Direktna i indirektna somatska embriogeneza se mogu paralelno javiti u istom eksplantatu. Ipak, indirektna somatska embriogeneza je najčešći put formiranja somatskih embriona u uslovima *in vitro*. Otpočinje formiranjem kalusa koji je na prvi pogled neorganizovana masa ćelija sa različitim stepenom

kompaktnosti. Smatralo se da se kalus sastoji od dediferenciranih ćelija, koje se dediferenciranjem vraćaju na početno embrionalno stanje, poput zigota, i tek tada imaju sposobnost da preusmere svoje razviće ka embrionalnom putu pod uticajem različitih stimulusa. Međutim, skorašnja istraživanja ukazuju da postoje različiti tipovi kalusa, koji poseduju različiti stepen diferencijacije (Ikeuchi *et al.*, 2013). Samo neke ćelije kalusa stiču kompetenciju za diferenciranje. Drugim rečima, dediferencijacija ćelija je prelazna faza iz jednog stanja diferencijacije u drugo (Fehér, 2019). Tokom procesa dediferencijacije, potentnost ćelija za diferencijaciju raste, tako da se ćelije mogu rediferencirati u drugi tip diferenciranih ćelija, a ceo proces se označava kao transdiferencijacija (Sugimoto *et al.*, 2011). Na primer, korenovi *Arabidopsis thaliana* gajeni na medijumu bogatom auksinom formiraju kalus koji se sastoji od ćelija sličnih apikalnom meristemu lateralnih korenova. Ovaj tip kalusa potiče od ćelija pericikla koje su blisko postavljene ksilemu i za koje se smatra da su pluripotentne, jer mogu da regenerišu meristeme korena i pupoljaka (Verdeil *et al.*, 2007; Atta *et al.*, 2009; Sugimoto *et al.*, 2010; Bustillo-Avendaño *et al.*, 2018). Pod uticajem citokina, primordije lateralnih korenova se mogu za samo nekoliko dana direktno, bez formiranja kalusa, transdiferencirati u pupoljke, ali je to moguće samo tokom vrlo kratkog perioda tokom njihovog razvića (Rosspopoff *et al.*, 2017). Ovo ukazuje da u ranim stupnjevima formiranja *de novo* pupoljaka ne dolazi do dediferencijacije ćelija kalusa kao što se ranije smatralo već dolazi do njegove rediferencijacije u različite tipove ćelija (Atta *et al.*, 2009; Sugimoto *et al.*, 2010; Rosspopoff *et al.*, 2017). Postojanje ovakvog tipa kalusa još uvek nije potvrđeno u somatskoj embriogenezi, ali je pokazano da somatski embrioni mogu da potiču iz ćelija kambijuma i prokambijuma (Guzzo *et al.*, 1994; Rose *et al.*, 2010; de Almeida *et al.*, 2012; Fehér, 2015, 2019). Da li u tim slučajevima somatska embriogeneza deli početne stupnjeve formiranja lateralnih korenova, još uvek treba da se utvrdi (Fehér, 2019).

Izolacija ćelija je od izuzetnog značaja za prelazak ćelija na embrionalni put razvića. Sprečavanje komunikacije između ćelija prekida njihove pozicione informacije i dotadašnje funkcije i dovodi do promena u njihovom programu razvića (Sugimoto *et al.*, 2019). Embriogene ćelije mogu biti izolovane od ostalih ćelija depozicijom kaloze (koja sprečava protok molekula - transkripcionih faktora, signalnih peptida, hormona, miRNK itd. kroz plazmodezme), osmotskim šokom (koji izaziva plazmolizu i prekid komunikacije između ćelija) ili dispergovanjem ćelija u suspenziji (Sugimoto *et al.*, 2019; Godel-Jedrychowska *et al.*, 2020). Mehanizam izolacije ćelija ne zavisi od tipa tkiva u kome se indukuje somatska embriogeneza niti od faktora koji je pokrenuo ovaj proces, a 2-deoksi-D-glukoza, osim što inhibira biosintezu kaloze, inhibira i somatsku embriogenezu (Godel-Jedrychowska *et al.*, 2020). Embriogene ćelije od kojih će nastati somatski embrioni su malih dimenzija sa krupnim jedrom i malom vakuolom, a često su odvojene debelim ćelijskim zidom bez plazmodezmi. Njihove histohemijske i ultrastrukturne osobine pokazuju povećanje sinteze RNK i metaboličke aktivnosti (Jiménez & Bangerth, 2001a). DNK u nukleusu je u euhromatinskom stanju, dok sa diferencijacijom i specijalizacijom ćelije dolazi do kondenzacije hromatina (Berenguer *et al.*, 2017; Sugimoto *et al.*, 2019).

Kada se jednom formiraju, embriogene ćelije nastavljaju da proliferišu i obrazuju proembriogenu masu (PEM). Nakon toga, počev od globularnog stadijuma razvića, razviće somatskih embriona se odvija kroz iste faze kao i u zigotskoj embriogenezi. Na obodu PEM dolazi do formiranja većeg broja manjih globularnih embriona koji daljim razvićem ulaze u stadijum srca i torpeda. U kotiledonarnom stadijumu, somatski embrioni su sposobni da klijaju u povoljnim uslovima, za razliku od zigotskih embriona koji prolaze kroz obaveznu fazu mirovanja (Zimmerman, 1993). Za razliku od zigotskih embriona, razviće somatskih embriona se lako može pratiti u kontrolisanim uslovima *in vitro*, te oni predstavljaju odličan model za izučavanje embriogeneze na biohemijskom i molekularnom nivou (Kawahara & Komamine, 1995).

1.1.2.1. Mehanizam indukcije somatske embriogeneze

Od kada je prvi put indukovana somatska embriogeneza u suspenzijama ćelija šargarepe, postalo je jasno da auksini imaju glavnu ulogu u ovom procesu. Iako kod mnogih biljnih vrsta različiti tretmani indukuju somatsku embriogenezu, pokazano je da većina tih tretmana utiče na nivo auksina u ćeliji, modifikujući njegov metabolizam (Andreae & Good, 1955; Davies, 1972; Michalczuk *et al.*, 1992; Fehér *et al.*, 2003; Pescador *et al.*, 2012a; Ayil-Gutiérrez *et al.*, 2013). Prema tome, narušavanje homeostaze auksina je ključno za sticanje embriogene kompetencije ćelija.

Pokazano je da ćelije eksplantata koje imaju veći nivo endogenih auksina stiču embriogenu kompetenciju i u odsustvu spoljašnjih stimulusa, što ukazuje da su ove ćelije sposobne da vrše *de novo* sintezu auksina (Dudits *et al.*, 1991; Ikeda-Iwai *et al.*, 2003; Jiménez & Thomas, 2006). Međutim, kod četinara se somatska embriogeneza teško indukuje uprkos tome što eksplantati sadrže visok nivo endogenih auksina, što ukazuje da nivo auksina koji je neophodan za indukciju somatske embriogeneze se razlikuje između vrsta i različitih tkiva (Liao *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2017). Kod mnogih biljnih vrsta je pokazano da nije važan početni nivo endogenih auksina u eksplantatima, već njegovo dinamično povećanje kao odgovor na faktore koji indukuju somatsku embriogenezu (Michalczuk *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 2002; Pasternak *et al.*, 2002; Wójcikowska *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2016; Vondrakova *et al.*, 2018; Awada *et al.*, 2019). Upravo takav nagli impuls auksina predstavlja neophodni signal za prelazak ćelija sa vegetativnog na embrionalni program razvića.

Jedan od važnih događaja u somatskoj embriogenezi je uspostavljanje bileteralne simetrije ćelije, a to je omogućeno formiranjem gradijenta auksina tokom faze indukcije (Schivone & Cooke, 1987; Liu *et al.*, 1993; Fischer & Neuhaus, 1996). Gradijent auksina se uspostavlja uz pomoć aktivnosti inluks simportera *AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1* (*AUX1/LAX*) i efluks transportera *PIN-FORMED* (*PIN*) i P-glukoproteina (*PGP*) (Petrášek & Friml, 2009). Upravo je ovaj transport zavistan od endogene količine auksina i neophodan je za razviće somatskih embriona. Čak i pre identifikacije *PIN* proteina, pokazano je da primena inhibitora za transport auksina remeti normalno razviće embriona kod nekoliko biljnih vrsta (Liu *et al.*, 1993; Hadfi *et al.*, 1998). Polarni transport auksina se vrši efluksom auksina zahvaljujući asimetričnoj lokalizaciji *PIN* proteina (Benková *et al.*, 2003), čija subcelularna lokalizacija zavisi od njegove fosforilacije, koju regulišu specifične kinaze i fosfataze (Friml *et al.*, 2004). Smatra se da uspostavljanje polarnog transporta auksina tokom somatske embriogeneze nastaje kao rezultat povratne sprege od strane novosintetisanih auksina. Lokalna sinteza auksina u apikalnom delu embriona reguliše njegov polaran transport čime se definiše apikalno-bazalna osa embriona (Robert *et al.*, 2013; Wabnik *et al.*, 2013).

Nakon procesa indukcije, auksini imaju inhibitorno dejstvo na razviće somatskih embriona (Dudits *et al.*, 1991). Gajenje kultura sa razvijenim embriogenim ćelijama na medijumu sa auksinom dovodi do razvijanja mase ćelija, jer su deobe ćelija intezivne i dolazi do proliferacije ćelija u svim pravcima (de Vries *et al.*, 1988).

1.1.2.2. Molekularni mehanizmi indukcije somatske embriogeneze

Somatske ćelije poseduju svu neophodnu genetičku informaciju koja im je potrebna za formiranje kompletne i funkcionalne biljke. Međutim, da bi se one diferencirale u somatske embrione neophodno je da dođe do reprogramiranja ekspresije gena, koja se dešava tokom njihove dediferencijacije i omogućava im da steknu embriogeni potencijal (Che *et al.*, 2006).

Kako u najvećem broju slučajeva za indukciju somatske embriogeneze se koriste auksini, koji izazivaju stvaranje gradijenta koncentracije endogenih auksina u eksplantatima, dolazi do značajnih promena u ekspresiji gena koji su uključeni u metabolizam i signalni put auksina (Yang *et al.*, 2012;

Xu *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2019; Quintana-Escobar *et al.*, 2019; Wójcik *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020). Na primer, tokom indukcije somatske embriogeneze pamuka detektovana je diferencijalna ekspresija više od 60% gena koji pripadaju familiji *AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID* (Aux/IAA) i *AUXIN RESPONSE FACTOR* (ARF) transkripcionim faktorima; kao i ekspresija gena uključenih u metabolizam auksina (Sun *et al.*, 2019). Auksini indukuju totipotenciju ćelija tako što hromatin čine dostupnim mašineriji za ekspresiju gena (Wang *et al.*, 2020a). Smatra se da specifičan Aux/IAA-ARF kompleks na odgovarajućem lokusu sprečava ekspresiju tih gena sprečavajući pristup kompleksa koji vrši remodelovanje hromatina (Wang *et al.*, 2020a). Posle tretmana auksinom, Aux/IAA bivaju degradirani što omogućava otvoreniju strukturu hromatina na lokusu u blizini ARF-vezujućeg mesta i ekspresiju specifičnih gena.

Sve veći broj publikacija ukazuje na blisku vezu između auksina i epigenetičke regulacije ekspresije gena posredstvom mikro ribonukleinskih kiselina (miRNK), remodelovanja hromatina i metilacije DNK (Zhu, 2010; Yamamuro *et al.*, 2016; Maury *et al.*, 2019; Wójcikowska *et al.*, 2020). Epigenetičke promene indukuju remodelovanje hromatina, čime se ukida utišavanje gena za embrionalno razviće u vegetativnim ćelijama (Nodine & Bartel, 2010; Loyola-Vargas, 2016; Feher, 2015; Osorio-Montalvo *et al.*, 2018; Nowicka *et al.*, 2019). Remodelovanje hromatina se vrši ubikvitinizacijom, metilacijom i acetilacijom (Jenuwein & Allis, 2001; de la Paz Sanchez *et al.*, 2015). Prva dva procesa vrše proteinski kompleksi: *Polycomb group* i *Trithorax group*, dok acetilaciju/deacetilaciju na ostatku lizina histona katalizuju acetiltransferaze, odnosno deacetilaze histona. Hiperacetilacija histona dovodi do relaksacije hromatina i omogućava ekspresiju gena (Shen *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016). Polycomb čine dva multiproteinska kompleksa *Repressive Complex 1* (PRC1) i *Repressive Complex 2* (PRC2); PRC2 vrši represiju transkripcije trimetilacijom lizina 27 u molekulu histona H3, za koji se zatim vezuje PRC1 i kondezujuje hromatin (Bratzel *et al.*, 2010; de la Paz Sanchez *et al.*, 2015). Suprotno tome, *Trithorax* kompleks vrši trimetilaciju lizina 4 u molekulu histona H3, oslobađajući time gene represije (Schuettengruber *et al.*, 2011; de la Paz Sanchez *et al.*, 2015). Navedeni kompleksi koordinisano i dinamički regulišu sve procese tokom životnog ciklusa biljnog organizma, uljučujući i somatsku embriogenezu (Duarte-Aké *et al.*, 2019). U somatskim ćelijama PRC2 sprečava dediferencijaciju visokodiferenciranih biljnih ćelija (Ikeuchi *et al.*, 2015). Mutacija gena koji kodiraju dve subjedinice PRC2, je dovela do proliferacije diferenciranih korenskih dlaka, formiranja kalusa i spontane regeneracije SE kod ovih mutanata *A. thaliana* (Ikeuchi *et al.*, 2015). Međutim, mutacija *PRC2* najčešće nije dovoljna za dediferencijaciju ćelija, već je neophodan i eksterni indukcionni tretman, najčešće auksin ili abiotički stres (Mozgová *et al.*, 2017). Kod *Medicago truncatula* je detektovan niži nivo ekspresije gena koji čine PRC1 kompleks i viši nivo ekspresije gena koji kodiraju subjedinice TrxG kompleksa u eksplantatima embriogene linije u odnosu na eksplantate neembriogene linije tokom indukcije somatske embriogeneze (Orłowska & Kępczyńska, 2018).

Trichostatin A (TSA) inhibira deacetilazu histona, vršeci time opštu i nespecifičnu derepresiju gena. TSA može efikasno pokrenuti proces somatske embriogeneze i u odsustvu eksternog stimulusa, kao što je 2,4-dihlorfenoksi sirćetna kiselina (2,4-D) kod *A. thaliana* (Wójcikowska *et al.*, 2018) ili toplotni stress kod *Brassica napus* (Li *et al.*, 2014) ili indukovati embriogeni odgovor eksplantata kod kojih se ovaj process znatno teže pokreće, npr. iz adultnih tkiva i mikrospora *A. thaliana* (Li *et al.*, 2014; Wójcikowska *et al.*, 2018) ili zrelih zigotskih embriona pšenice (Bie *et al.*, 2020). Kod *A. thaliana* TSA i 2,4-D istim mehanizmom pokreću somatsku embriogenezu, povećanjem ekspresije *YUCCA* gena, čime se povećava biosinteza auksina i pokreće kaskada derepresije transkripcionih faktora *LEAFY COTYLEDON (LEC1, LEC2)*, *AGAMOUS LIKE 15 (AGL15)*, *MYELOBLASTOSIS 118 (MYB118)*, *FUSCA 3 (FUS3)* i *BABYBOOM (BBM)* koji učestvuju u formiranju embrionalnog identiteta ćelija (Wójcikowska *et al.*, 2018).

Tokom procesa reprogramiranja mikrospora *B. napus* i *Hordeum vulgare* primenom visoke (32°C), odnosno niske (4°C) temperature, na embrionalni put razvića uočen je nizak nivo metilacije histona, koji se zatim povećavao tokom razvića embriona (Berenguer *et al.*, 2017). U skladu s tim, BIX-01294, specifičan inhibitor metiltransferaze histona, je pozitivno delovao na povećanje frekvence inicijacije embriogeneze, ali je inhibirao diferencijaciju somatskih embriona (Berenguer *et al.*, 2017).

Odavno je poznato da egzogena primena auksina povećava nivo metilacije DNK u kulturama embriogenih ćelija šargarepe (LoSchiavo *et al.*, 1989). Kasnije je kod mnogih biljnih vrsta pokazano da je balans između metilacije i demetilacije DNK ključan za indukciju somatske embriogeneze (Leljak-Levanić *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012a; Ji *et al.*, 2019). Nivo metilacije DNK se razlikuje u embriogenim i neembriogenim tkivima i menja se tokom procesa indukciju somatske embriogeneze (De-la-Peña *et al.*, 2015). Na metilaciju/demetilaciju DNK utiče veliki broj faktora: genetički faktor, starost i fiziološko stanje eksplantata, sastav medijuma za kokultivaciju, posebno BRR, jedinjenja koja sekretuju eksplantati, uslovi kultivacije itd. (De-la-Peña *et al.*, 2015).

Povećana ekspresija *Met1* gena, koji kodira enzim DNK metiltransferazu, uočena je kod *A. thaliana* nakon indukcije somatske embriogeneze egzogenom primenom auksina, pre nego što uopšte dođe do formiranja embriogenih ćelija, dok je primena 5-azacitidina (inhibitora metiltransferaze) sprečila formiranje embriogenih ćelija (Xiao *et al.*, 2006). Kod kafe je 5-azacitidin inhibirao somatsku embriogenezu u ranoj fazi indukcije (7-14 dana), dok je njegova kasnija primena pozitivno delovala na embriogeni potencijal i sinhronizaciju somatske embriogeneze (Nic-Can *et al.*, 2013). Nasuprot tome, kratak pretretman 5-azacitidinom je izazvao povećanje embriogenog potencijala mikrospora uljane repice i ječma (Solís *et al.*, 2015) i ubrzao proces somatske embriogeneze iz embrionalnog tkiva kokosove palme indukujući raniju pojavu pika ekspresije *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK)*, *WUSCHEL (WUS)*, *BBM* i *LEC* i smanjenje ekspresije *PICKLE (PKL)* (Osorio-Montalvo *et al.*, 2020). Kod kakaa je gubitak potencijala somatskih embriona za formiranje sekundarnih embriona usled dugotrajne kultivacije bio sprečen tretmanom 5-azacitidinom (Pila Quinga *et al.*, 2017).

Iako opšta demetilacija DNK izazvana 5-azacitidinom može pokrenuti ekspresiju gena za embrionalni identitet, još važnija je metilacija specifičnih regiona DNK, odnosno promotorskog i kodirajućeg regiona ovih gena izazvana 2,4-D tretmanom (Grzybkowska *et al.*, 2020). Stabilna ekspresija ovih gena je detektovana samo pri optimalnoj koncentraciji 2,4-D u medijumu za indukciju somatske embriogeneze, pri kojoj su promotorski regioni ovih gena bili hipermetilovani u odnosu na eksplantate kultivisane na medijumu sa sub- i supra-optimalnom koncentracijom 2,4-D (Grzybkowska *et al.*, 2020). Hipermetilacija promotora može i stimulisati (Li *et al.*, 2019a) i suprimirati (Berdasco *et al.*, 2008) ekspresiju spomenutih gena.

Značajnu ulogu u indukciji somatske embriogeneze imaju miRNK, jer je uočena njihova specifična ekspresija na određenim stupnjevima somatske embriogeneze (Luo *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012a, 2017a; Alejandri-Ramírez *et al.*, 2018; Siddiqui *et al.*, 2019; Sabana *et al.*, 2020). Smatra se da miRNK imaju ulogu u uspostavljanju polarnosti ćelija, utičući na endogeni nivo auksina u ćeliji (Thibaud-Nissen *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2014). Pokazano je da miRNK stimulišu ekspresiju gena koji kodiraju auksinske receptore, čime se povećava osetljivost eksplantata na auksine i sticanje embriogene kompetencije (Wójcik & Gaj, 2016; Szyrajew *et al.*, 2017). Pored toga, miRNK utiči na signalni put auksina, povećavajući degradaciju Aux/IAA represora i stimulišući ekspresiju ARF transkripcionih faktora (Rubio-Somoza & Weigel, 2011; Si-Ammour *et al.*, 2011; Wójcikowska & Gaj, 2017).

Većina gena koji se eksprimiraju tokom somatske embriogeneze kodira transkripcione faktore ili enzime za remodelovanje hromatina (Smertenko & Bozhkov, 2014). Iako su funkcije tih gena poznate, još uvek se nedovoljno zna o molekularnom mehanizmu prelaska somatske ćelije iz vegetativnog na embrionalni program razvića.

Kompleksna mreža transkripcionih faktora koja učestvuje u održavanju apikalnog meristema izdanka (*shoot apical meristem* - SAM) takođe učestvuje u regulaciji somatske embriogeneze, jer je pokazano da njihova ektopična ekspresija stimuliše prelazak somatskih ćelija iz vegetativnog na embrionalni put razvića. Održavanje i formiranje SAM se odvija mehanizmom negativne i pozitivne povratne sprege u kojoj učestvuju *WUS*, *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*), *ZWILLE* (*ZLL*) i *CLAVATA* (*CLV*) transkripcioni faktori (Gordon *et al.*, 2007). U početnim fazama somatske embriogeneze dolazi do povećane ektopične ekspresija *WUS* koju indukuje uspostavljeni gradijent auksina (Su *et al.*, 2009). *WUS* promovise prelazak somatskih ćelija iz vegetativnog u embrionalno stanje i učestvuje u određivanju identiteta matičnih ćelija SAM, dok *STM* i *CLV* imaju antagonističke funkcije u kontroli ekspresije *WUS* (Clark *et al.*, 1996; Somssich *et al.*, 2016; Negin *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017b).

Zigotska i somatska embriogeneza se razlikuju u početnim stadijumima razvića embriona, zato što zigotski embrion nastaje iz visoko diferenciranog i polarizovanog zigota (Su *et al.*, 2009). U zigotskoj embriogenezi već pri prvoj ćelijskoj deobi nastaje manja apikalna i veća bazalna ćelija. Kod *A. thaliana* *WUSCHEL-related homeobox 2* (*WOX2*) se specifično eksprimira u apikalnoj, a *WOX8* u bazalnoj ćeliji zigota (Haecker *et al.*, 2004). Ekspresija specifičnih *WOX* gena je neophodna za uspostavljanje apikalno-bazalne osovine embriona (Breuninger *et al.*, 2008), a kad se ona uspostavi, *WUS* se eksprimira u ćelijama SAM počev od stadijuma embriona sa 16 ćelija, a *WOX5* u ćelijama RAM od stadijuma sa 32 ćelije (Mayer *et al.*, 1998; Haecker *et al.*, 2004).

Kompleksna interakcija transkripcionih faktora *LEC*, *BBM*, *FUS3*, *AGL15* i *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3* (*ABI3*) efikasno indukuje somatsku embriogenezu i razviće embriona (Stone *et al.*, 2001; Boutilier *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2013; Radoeva & Weijers, 2014; Horstman *et al.*, 2017a). Ektopična ekspresija *BBM* određuje identitet i totipotentnost somatskih ćelija (Horstman *et al.*, 2017a). *BBM* je na hijerarhijski višem nivou regulacije somatske embriogeneze jer reguliše ekspresiju *LEC1-ABI3-FUS3-LEC2* (Horstman *et al.*, 2017b). *LEC1/L1L*, *ABI3*, *FUS3* i *LEC2* se u literaturi označavaju kao LAFL proteini, jer kolektivno regulišu proces embriogeneze, od identiteta embrionalnih ćelija, do sazrevanja i dormancije embriona (Jia *et al.*, 2014). Ektopična ekspresija *BBM*, *LEC1* i *LEC2* pojedinačno je dovoljna za indukciju somatske embriogeneze, dok ektopična ekspresija *AGL15*, *FUS3* ili *ABI3* stimuliše somatsku embriogenezu, ali nije u stanju da je indukuje (Horstman *et al.*, 2017a). *LEC* promovise biosintezu auksina, stimulišući ekspresiju *YUCCA* gena (Gaj *et al.*, 2005; Stone *et al.*, 2008; Wójcikowska & Gaj, 2015) i pozitivno reguliše aktivnost *AGL15* čija je uloga da stimuliše dediferencijaciju ćelija (Braybrook *et al.*, 2006, 2008). *FUS3* i *ABI3* regulišu konverziju embriona u klijance. *SERK* i *LAFL* na vrlo kompleksan način vrše međusobnu pozitivnu i negativnu regulaciju ekspresije (Zheng *et al.*, 2009, 2013; Zheng & Perry, 2014; Liu *et al.*, 2018a; Pérez-Pascual *et al.*, 2018).

U klijancima je aktivnost pomenutih transkripcionih faktora suprimirana, kako ne bi ometali njihovo vegetativno razviće (Holdsworth *et al.*, 2008). Ova inhibicija je posredovana genima koji kodiraju enzime za remodelovanje hromatina, a glavnu ulogu ima *PKL* koji kodira hromatin-remodelujuću ATP-azu (Rider *et al.*, 2003; Henderson *et al.*, 2004). Pretpostavlja se da somatska embriogeneza predstavlja put razvića koji je suprimiran na nivou hromatina u vegetativnim ćelijama. Stoga, somatska embriogeneza se ne bi mogla smatrati procesom koji se indukuje, već procesom koji se oslobađa supresije (Fehér, 2008, 2019).

Smatra se da postoje bar dva nezavisna mehanizma indukcije somatske embriogeneze kod *A. thaliana*, koje regulišu transkripcioni faktori WUS i LEC1 (Fehér *et al.*, 2016). Pod uticajem 2,4-D iz nezrelih zigotskih embriona na kotiledonarnom stadijumu razvića direktno regenerišu somatski embrioni (Gaj *et al.*, 2005), dok pri nešto većoj koncentraciji 2,4-D, iz istih eksplantata se formira embriogeni kalus, a do regeneracije somatskih embriona dolazi ubrzo posle izostavljanja auksina iz medijuma (Su *et al.*, 2009). Već 16 h posle subkultivacije embriogenih kalusa na medijum bez auksina, uočeno je prisustvo povećane koncentracije endogenog auksina na obodima kalusa, kao i ekspresija *PINI*, dok je ekspresija *WUS* detektovana u regionu nekoliko slojeva ćelija niže, tačno ispod regiona ekspresije *PINI*, u regionu sa niskim nivoom auksina (Su *et al.*, 2009). Osim *WUS*, detektovana je i rana ekspresija *WOX5* u preklapajućim regionima embriogenog kalusa, pre nego što somatski embrioni postanu vidljivi (Su *et al.*, 2015). Smatra se da uklanjanje auksina može izazvati transport citokinina u specifičan region embriogenog kalusa i omogućiti ispravnu ekspresiju *WOX5* (Su *et al.*, 2015). Korektna ekspresija *WUS* i *WOX5* je od ključnog značaja za uspostavljanje SAM i RAM i bazalno-apikalne osovine somatskih embriona. Auksin se posle indukcije *WUS* redistribuira i akumulira u apikalnim ćelijama proembriona, zatim u primordijama kotiledona, pa u radikuli (Su *et al.*, 2009). Primordije kotiledona se zatim formiraju u oblasti maksimuma auksina na periferiji kalusa.

Drugi mehanizam indukcije somatske embriogeneze se zasniva na transkripcionom faktoru LEC1, koji je glavni regulator razvića embriona i semena (Jo *et al.*, 2019), koji integriše dejstvo transkripcionih faktora, hormona i svetlosti (Junker *et al.*, 2012). LEC1 pripada familiji NF-YB proteina, koji nemaju DNK-vezujući domen, već se kao kompleks sa NF-YC i NF-YA proteinima vezuju za CCAAT *cis* regulatornu sekvencu (Boulard *et al.*, 2018; Jo *et al.*, 2020). LEC1 direktno interaguje sa velikim brojem transkripcionih faktora i zahvaljujući tome, kao deo multiproteinskog kompleksa, dinamički reguliše ekspresiju velikog broja gena tokom svih faza razvića semena (Jo *et al.*, 2020). LEC1 pokreće ekspresiju ostalih regulatora razvića semena: *ABI3*, *FUS3*, *LEAFY* *COTYLEDON-LIKE 1* (*LILI*) i *LEC2* (Pelletier *et al.*, 2017). *LEC1* je regulaciono mesto kontrole tranzicije embrionalnog u vegetativno razviće, jer je upravo ovaj gen pod negativnom kontrolom PKL, *VIVIPAROUS ABI3-LIKE* (*VAL1/VAL2*) i pozitivnom kontrolom transkripcionih faktora MYB118 i MYB115, koji deluju nezavisno od PKL i *WUS* (Ogas *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2013).

Većina transkripcionih faktora koja je aktivna tokom somatske embriogeneze intereaguje sa metaboličkim i signalnim putevima hormona (Nowak & Gaj, 2016). Za 40% transkripcionih faktora uključenih u indukciju somatske embriogeneze kod *A. thaliana* je pokazano da modulišu ekspresiju gena koji su uključeni u metabolizam i signalni put auksina (Gliwicka *et al.*, 2013). LEC1 može da zameni puls auksina potreban za pokretanje somatske embriogeneze zahvaljujući tome što sam stimuliše ekspresiju *YUCCA* gena (Lotan *et al.*, 1998; Junker *et al.*, 2012), ali i kroz pokretanje ekspresije *LEC2*, koji takođe pozitivno reguliše ekspresiju *YUCCA* gena, koji kodiraju ključne enzime za biosintezu auksina iz triptofana (Wójcikowska *et al.*, 2013). Osim LEC, *SERK* takođe stimuliše ekspresiju *YUCCA* gena, kao i polarni transport auksina preko PIN1 i PIN4 transportera i percepciju auksina preko *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1* (*TIR1*) receptora (Pérez-Pascual *et al.*, 2018). *LILI*, iz familije *LEC1* gena, stimuliše ekspresiju *PHOSPHATASE 2AA2* gena, čiji proizvod reguliše defosforilaciju PIN1 i time reguliše polarni transport i distribuciju auksina (Xu *et al.*, 2019a).

LEC1 direktno interaguje sa DELLA proteinima, koji inhibiraju njegovu aktivnost, dok ga bioaktivni giberelini (GA), koji se akumuliraju tokom rane faze razvića embriona, oslobađaju inhibicije (Hu *et al.*, 2018a). Prekomerna ekspresija *LEC1* izazvala je smanjenje nivoa endogene abscisinske kiseline (ABA) i povećanje GA, indol 3-sirćetne kiseline (IAA) i citokinina (Xu *et al.*, 2019b). *FUS3* takođe integriše hormonske signale, jer ekspresiju ovog gena stimuliše ABA, a

suprimiraju GA (Chiu *et al.*, 2016). Prekomerna ekspresija *CsFUS3* *Citrus* sp. uspostavlja povoljno okruženje za regeneraciju somatskih embriona, bar delimično uspostavljanjem visokog odnosa ABA i GA (Liu *et al.*, 2018a). Tretman eksplantata soje sa GA₃ je značajno smanjio ekspresiju *AGL15*, *AGL18*, *ABI3* i *FUS3*, dok je paklobutrazol (PAC) uticao na povećanje ekspresije navedenih gena i suprimirao ekspresiju *Giberelin-2-oksidade* (*GA2-ox6*) i *TIR1* (Zheng & Perry, 2014; Zheng *et al.*, 2016). *AGL15* utiče na biosintezu i percepciju etilena (Zheng *et al.*, 2013). Etilen i GA najčešće imaju antagonističko dejstvo na somatsku embriogenezu (Weiss & Ori, 2007). Smatra se da *AGL15* promoviše somatsku embriogenezu stimulacijom ekspresije *AtGA2-ox6* i smanjenjem nivoa GA (Wang *et al.*, 2004). PKL takođe vrši svoj inhibitorski uticaj regulacijom signalnog puta GA (Ogas *et al.*, 1999; Henderson *et al.*, 2004).

PKL i *VAL* geni kodiraju hromatin remodelirajuće faktore koji inhibira ekspresiju *LEC1* gena nakon klijanja semena (Ogas *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2007). PKL reprimira ekspresiju *LEC1* metilacijom histona, a *VAL1* i *VAL2* interakcijom sa deacetilazama histona *HDC19* i *HDC6* (Ogas *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2013). Korenovi *pkl* mutanta gajeni na medijumu bez BRR, spontano formiraju kalusno tkivo i somatske embrione (Thomas & Jiménez, 2005), a kod dvostrukih *val1 val2* mutanata somatski embrioni spontano regenerišu iz SAM klijanaca (Suzuki *et al.*, 2007). Klijanci *pkl* pokazuju mnoge embrionalne osobine kao što je npr. intenzivno nagomilavanje rezervnih materija (Ogas *et al.*, 1999). *DELLA* proteini interaguju sa PKL i sprečavaju njegovu aktivnost, a GA ga oslobađaju represije (Zhang *et al.*, 2014b). Inhibitori biosinteze giberelina stimulišu somatsku embriogenezu kod *pkl* i *val1/val2* mutanata (Ogas *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 2007).

1.1.2.3. Molekularni markeri specifični za somatsku embriogenezu

Većina poznatih gena je aktivna tek u kasnijim fazama somatske embriogeneze, dok još uvek ostaje nepoznato koji su molekularni osnovi prelaska somatske ćelije iz vegetativnog u embrionalni status (Nakano *et al.*, 2006; Vergne & Dumas, 2000; Jha *et al.*, 2020). Kako do sada nisu otkriveni citološki markeri za razlikovanje embriogenih od neembriogenih ćelija, kloniranje pojedinih gena je omogućilo njihovu upotrebu kao genetičkih markera za somatsku embriogenezu. Detektovanje njihove ekspresije u fazi indukcije somatske embriogeneze omogućava kvantifikaciju embriogenog potencijala i pre vidljivih morfoloških promena na tkivu iz koga somatski embrioni regenerišu (Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015).

SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK)

Ekspresija *SERK* gena je prvi put detektovana u embriogenim kulturama šargarepe u prisustvu auksina. Ekspresija je bila najveća u embriogenim ćelijama sve do globularnog stadijuma razvića, usled čega je predloženo da se *SERK* geni mogu koristiti kao molekularni markeri za detekciju somatske embriogeneze na ranim stupnjevima razvića (Schmidt *et al.*, 1997). Kasnije je pokazano da je ekspresija *SERK* gena usko povezana sa prelaskom somatskih ćelija iz vegetativnog na embrionalni put razvića kod mnogih biljnih vrsta (Hecht *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2004; Maillot *et al.*, 2009; Steiner *et al.*, 2012; Singh & Khurana, 2017). Prekomerna ekspresija *SERK* snažno stimuliše proces somatske embriogeneze, dok supresija ovog gena dovodi do skoro potpunog gubitka embriogenog potencijala (Zheng *et al.*, 2016; Pérez-Pascual *et al.*, 2018). Pored njegove uloge u somatskoj embriogenezi, pokazano je da je ekspresija *SERK* gena u korelaciji sa indukcijom *de novo* razvića pupoljaka (Thomas *et al.*, 2004).

SERK geni kodiraju za receptornu kinazu bogatu leucinskim ponovcima (*Leucine Rich Repeat-Receptor Like Kinases* - LRR-RLK) koje su veoma važne u signalnim putevima kod biljaka, a pokazano je da stimulišu dediferencijaciju i omogućavaju totipotenciju biljnih ćelija (Toonen *et al.*,

1994; Pilarska *et al.*, 2016). Kod mnogih biljnih vrsta je pokazano da SERK kodiraju familije gena, npr. pet članova je identifikovano kod *A.thaliana* (Hecht *et al.*, 2001), a dva kod pirinča (Ito *et al.*, 2005). Geni u okviru SERK familije mogu imati različite funkcije i njihovu ekspresiju mogu indukovati različiti stimulusi. Na primer, kod *Triticum aestivum* ekspresiju *SERK2* i *SERK3* indukuju auksini, dok je ekspresija ostalih članova ove familije gena najveća u prisustvu brasinosteroida (Singh & Khurana, 2017). Pored toga, ekspresija *SERK* gena je detektovana u različitim biljnim organima, kao što su apikalni meristemi, korenovi i listovi tokom različitih faza rastenja i razvića biljaka (Santos *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2009; Maillot *et al.*, 2009). Takođe, ekspresiju *SERK* gena mogu indukovati različiti biotički faktori, kao što je npr. napad patogena (Hu *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2011). Sve navedeno ukazuje da se *SERK* geni ne mogu koristiti kao pouzdani markeri za somatsku embriogenezu (Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015).

LEAFY COTYLEDON (LEC)

LEC geni, *LEC1* i *LEC2*, su prvi otkriveni transkripcioni faktori za koje je pokazano da indukuju somatsku embriogenezu kada se ektopično ekspimiraju u klijancima (Lotan *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 2001). Tokom ranih faza somatske embriogeneze *LEC* geni određuju identitet ćelija suspenzora, dok u kasnijim fazama stimulišu maturaciju i sprečavaju prerano klijanje embriona (Meinke *et al.*, 1994; Stone *et al.*, 2001, 2008; Jo *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2020). *LEC1* pripada familiji NF-YB regulatornih proteina (Boulard *et al.*, 2018; Jo *et al.*, 2020), a *LEC2* spada u familiju B3 transkripcionih faktora, koji se B3 domenom vezuju za RY motiv u promotoru gena čiju ekspresiju regulišu (Lee *et al.*, 2003).

Kod mnogih biljnih vrsta je pokazana korelacija između ekspresije *LEC* gena i povećanja embriogenog potencijala (Ledwon & Gaj, 2011; Ayil-Gutiérrez *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014a; Brand *et al.*, 2019). Zanimljivo je da u prirodnim uslovima kod *Kalanchoe daigremontiana* upravo *LEC1* pokreće regeneraciju somatskih embriona na obodima listova (Garces *et al.*, 2007). *LEC* geni indukuju somatsku embriogenezu i bez prisustva BRR, povećavajući nivo endogenih auksina (Wójcikowska *et al.*, 2013; Wójcikowska & Gaj, 2015). Kako je do sada specifična ekspresija *LEC* gena detektovana samo tokom embriogeneze, oni se mogu smatrati veoma pouzdanim markerom za somatsku embriogenezu (Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015).

WUSCHEL (WUS)

WUS je važan transkripcioni faktor, koji reguliše određivanje identiteta matičnih ćelija SAM (Laux *et al.*, 1996). Korelacija između ektopične ekspresija *WUS* gena i prelaska ćelije iz vegetativnog na embriogeni program razvića je pokazana kod mnogih biljnih vrsta (Chen *et al.*, 2009; Santa-Catarina *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2014). Auksini indukuju ekspresiju *WUS* gena koji promovišu proliferaciju i dedifrencijaciju somatskih ćelija i pozitivno reguliše ekspresiju *LEC* gena (Zuo *et al.*, 2002; Márquez-López *et al.*, 2018). Uloga *WUS* gena u somatskoj embriogenezi se može objasniti njegovom sposobnošću da indukuju produkciju matičnih ćelija, koje mogu biti pluripotentne ili totipotentne i da na taj način obezbede potencijalni izvor ćelija od kojih će se formirati somatski embrioni (Zuo *et al.*, 2002). Kao i *LEC*, *WUS* geni se smatraju pouzdanim markerom za somatsku embriogenezu (Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015).

BABYBOOM (BBM)

BBM geni kodiraju za protein koji pripada familiji AP2/ERF (Karami *et al.*, 2009) i izolovani su iz kulture mikrospora *Brassica napus* (Boutilier *et al.* 2002). Kod *A.thaliana* i *B. napus* ektopična ekspresija *BBM* stimuliše prelazak sa vegetativnog na embrionalni program razvića, indukujući

somatsku embriogenezu spontano, bez prisustva BRR (Kulinska-Lukaszek *et al.*, 2012). Međutim, ekspresija *BBM* gena se može razlikovati kod različitih biljnih vrsta na različitim stupnjevima razvića somatskih embriona. Ekspresija *BBM* gena kod *Coffea canephora* je detektovana tek nakon indukcije somatske embriogeneze (Silva *et al.*, 2015), dok je prekomerna ekspresija ovog gena inhibirala kasnije razviće somatskih embriona kod *Theobroma cacao* (Florez *et al.*, 2015). Zbog svoje različite ekspresije kod različitih biljnih vrsta, *BBM* gen ipak nije pouzdan marker za somatsku embriogenezu.

AGAMOUS LIKE 15 (AGL15)

Ektopična ekspresija *AGL15* gena dovodi do učestalijeg formiranja somatskih embriona u eksplantatima koji su gajeni na medijumu bogatom auksinima i omogućava dugogodišnje (preko 20 godina) održavanje embriogenog potencijala, dok mutacija ovog gena dovodi do značajnog smanjenja embriogenog potencijala mutanata (Harding *et al.*, 2003; Thakare *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2016). Istraživanja na *A. thaliana* su pokazala da *AGL15* geni pripadaju MADS-box familiji gena i da se eksprimiraju tokom svih faza razvića embriona, ali da njihova ekspresija opada nakon klijanja embriona (Fernandez *et al.*, 2000; Thakare *et al.*, 2008). Primetna je sličnost u funkcijama ovih gena sa *SERK* i *LEC* genima, što naglašava da oni nisu potpuno izdvojeni u indukciji somatske embriogeneze, već se njihovi putevi u određenoj meri preklapaju (Braybrook *et al.*, 2006).

1.1.2.4. Faktori koji utiču na somatsku embriogenezu

Somatske biljne ćelije nisu trajno diferencirane i zbog toga mogu povratiti totipotenciju i pokrenuti embrionalni put razvića u odgovarajućim uslovima kultivacije. Iako je ovaj fenomen poznat već više od 60 godina, još uvek je misteriozan, jer se i dalje ne zna zašto su određeni genotipovi, eksplantati ili ćelije podložniji somatskoj embriogenezi od ostalih (Fehér, 2008, 2019). Optimizacijom različitih uslova kultivacije moguće je indukovati somatsku embriogenezu kod većine biljnih vrsta, međutim utvrđivanje takvih uslova je izrazito teško zbog postojanja velikog broja faktora koji utiču na sticanje embriogene kompetencije somatskih ćelija (Ji *et al.*, 2011). Veliki broj publikacija ukazuje da je embriogeni potencijal pre svega genetički determinisan. To je potvrđeno uspešnim prenosom regenerativnih sposobnosti sa embriogenih na neembriogene genotipove seksualnim ukrstanjem (Moltrasio *et al.*, 2004). Pretpostavlja se da sve biljne ćelije imaju sposobnost regeneracije, ali da ispoljavanje embriogenih osobina zavisi od fiziološkog stanja ćelije koje je determinisano složenom interakcijom genetičkih i egzogenih faktora (von Arnold *et al.*, 2002; Fehér, 2008).

Genotip

Genotip predstavlja jedan od najvažnijih faktora koji određuje regenerativni potencijal kod mnogih biljnih vrsta. Uočena je velika varijabilnost u regenerativnom odgovoru kod različitih genotipova u okviru iste vrste i varijeteta, što je pokazano kod *Arachis hypogea* (Radhakrishnan *et al.*, 2001), pamuka (Zhang *et al.*, 2001), pirinča (Huang *et al.*, 2002; Lee & Huang, 2013), krastavca (Yang *et al.*, 2003), graška (Wang *et al.*, 2005) i mnogih drugih biljnih vrsta. Prisustvo ovako velike genetičke varijabilnosti može objasniti zašto različiti faktori kod različitih biljnih vrsta indukuju isti odgovor ćelija i zašto se kod pojedinih vrsta i pored optimizacije mnogih protokola i dalje teško postiže *de novo* regeneracija (Delporte *et al.*, 2014).

Pokazano je da se potencijal za *de novo* regeneraciju nasleđuje kroz generacije (Bolibok *et al.*, 2007; Anami *et al.*, 2010; Milojević *et al.*, 2011). Stoga, selekcija genotipova sa visokim regenerativnim potencijalom je od velikog značaja za postizanje uspešne regeneracije u uslovima *in vitro* (Bolibok *et al.*, 2007; Milojević *et al.*, 2011). Primena konvencionalnih metoda za selekciju visoko regenerativnih genotipova je skupa i dugotrajna, pa se sve više teži korišćenju genetičkih

metoda i otkrivanju gena koji kontrolišu visok regenerativni potencijal (Song *et al.*, 2010). Na osnovu klasičnih genetičkih studija prvobitno su otkrivena dva komplementarna gena koji kontrolišu sposobnost za somatsku embriogenezu (Pueschel *et al.*, 2003; Moltrasio *et al.*, 2004), međutim upotreba molekularnih markera je omogućila da se identifikuju i mapiraju specifični lokusi *Quantitative Trait Loci* (QTL) povezani sa regenerativnim potencijalom (Nishimura *et al.*, 2005; Bolibok *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2010; Priyono *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015a; Salvo *et al.*, 2018). Postojanje velike varijabilnosti u regenerativnom odgovoru različitih genotipova je u korelaciji sa velikim brojem lokusa na različitim hromozomima, što ukazuje da je regenerativni potencijal pod poligenom kontrolom (Jia *et al.*, 2007, 2009).

Biljni regulatori rasteња

Među različitim faktorima koji indukuju somatsku embriogenezu, BRR imaju najznačajniju ulogu stimulišući diferencijaciju i nastanak embriogenih ćelija (Sun & Hong, 2010; Huang *et al.*, 2012b; Awasthi *et al.*, 2017; Márquez-López *et al.*, 2018; Grzybkowska *et al.*, 2018). Ipak, uloga BRR u somatskoj embriogenezi se ne može generalizovati, jer su kod mnogih biljnih vrsta pokazane njihove kontradiktorne uloge u indukciji somatske embriogeneze (Ji *et al.*, 2011). Pored toga, nivo endogenih hormona se veoma razlikuje među eksplantatima, čime se potrebe tkiva za egzogenom primenom BRR mogu razlikovati (Jiménez, 2005).

U jednoj studiji je pokazano da je indukcija somatske embriogeneze bez primene BRR postignuta samo u 7% protokola, dok čak u 80% protokola je bila neophodna primena auksina ili njihova kombinacija sa citokinima (Gaj, 2004). Česta primena auksina i citokina u indukciji somatske embriogeneze nije začeđujuća pošto oni imaju značajne uloge u stimulaciji ćelijskih deoba i regulaciji ćelijskog ciklusa (Fehér *et al.*, 2003; Gaj, 2004; Raghavan, 2004; Jiménez, 2005). Najčešće korišćeni auksin u indukciji somatske embriogeneze je 2,4-D (Karami *et al.*, 2009; Nic-Can *et al.*, 2016; Chávez-Cortazar *et al.*, 2020). Na primer, pokazano je da primena 2,4-D u vrlo niskim koncentracijama može da poveća i do 20 puta embriogeni odgovor kod nekih vrsta (Abohatem *et al.*, 2017). Na koji način 2,4-D efikasno indukuje embriogeni odgovor kod mnogih biljnih vrsta nije do kraja razjašnjeno. Mnogi autori smatraju da 2,4-D može da deluje kao stresni signal, što ide u prilog činjenici da somatska embriogeneza predstavlja odgovor biljaka na stresne uslove (Feher, 2003; Gaj, 2004). Uloga 2,4-D u indukciji somatske embriogeneze može biti i indirektna, preko povećanja nivoa endogenih auksina (Michalczuk *et al.*, 1992; Jiménez, 2005). Pokazano je da pretretman biljaka *Coffea canephora* sa 2,4-D značajno povećava nivo endogenih auksina i pre indukcije somatske embriogeneze, čime povećava embriogeni potencijal ove biljne vrste (Ayil-Gutiérrez *et al.*, 2013). Za razliku od 2,4-D, primena α -naftil-sirćetne kiseline (NAA) i IAA u indukciji somatske embriogeneze je značajno manja. Iako primena NAA najčešće dovodi do formiranja neembriogenog kalusa (Chee, 1995), kod pojedinih biljnih vrsta je uočen pozitivan efekat NAA u indukciji somatske embriogeneze (Komai *et al.*, 1996a; Knoll *et al.*, 1997; Szewczyk-Taranek *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2018a; Xu *et al.*, 2019c).

Uticao citokina na indukciju somatske embriogeneze je veoma varijabilan. Kod većine biljnih vrsta niske koncentracije citokina u kombinaciji sa auksinom promovisu somatsku embriogenezu, ali je uočen i inhibitoran efekat citokina kod manjeg broja vrsta (Knoll *et al.*, 1997; Mujib *et al.*, 2016). Tek kod nekoliko vrsta je pokazano da je samo prisustvo citokina dovoljno za indukciju somatske embriogeneze (Zdravković-Korać & Nešković, 1999; Sagare *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2005). Najčešće korišćen citokin u indukciji somatske embriogeneze je N⁶-benzilaminopurin (BAP) (Werbrouck *et al.*, 1996; Rahman *et al.*, 2018). Iako je primena BAP veoma efikasna i ekonomična, visoke koncentracije ovog citokina mogu dovesti do pojave različitih abnormalnosti kod mnogih

biljnih vrsta, kao što je pojava hipohidrataisanosti (Bairu *et al.*, 2007). Za razliku od toga, primena tidiazurona (TDZ), u značajno nižim koncentracijama se pokazala efikasnijom u indukciji somatske embriogeneze u poređenju sa drugim citokininima (Visser *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 2004; Panaia *et al.*, 2004; Ghosh *et al.*, 2018). TDZ je derivat feniluree sa snažnim citokininskim dejstvom za kojeg je pokazano da indukuje somatsku embriogenezu menajući nivo endogenih auksina i citokinina u eksplantatima (Murthy *et al.*, 1995).

Primena GA, ABA ili etilena najčešće nije neophodna za indukciju somatske embriogeneze. ABA je imala pozitivan efekat na indukciju somatske embriogeneze kod šargarepe (Nishiwaki *et al.*, 2000) i papaje (Fitch, 1993), ali je kod mnogih biljnih vrsta prisutvo ABA bilo neophodno u kasnijim fazama somatske embriogeneze tokom sazrevanja embriona (Dodeman *et al.*, 1997). Etilen najčešće inhibira somatsku embriogenezu (Thorpe, 2000), ili ne utiče na indukciju ovog procesa (Roustan *et al.*, 1994). Uticaj GA u indukciji i razviću somatskih embriona varira kod različitih biljnih vrsta i tipova eksplantata (Chen & Lai, 2001). Egzogenom primenom inhibitora biosinteze GA se može utvrditi moguća uloga GA u procesima regeneracije kod biljaka.

Uticaj gibberelina i paklobutrazola na indukciju somatske embriogeneze

U poslednjih nekoliko decenija, PAC se sve češće uključuje u protokole za indukciju *de novo* regeneracije biljaka u uslovima *in vitro* (George *et al.*, 2008). Njegov uticaj na procese *de novo* organogeneze i somatske embriogeneze je najčešće stimulativan, ali to pre svega zavisi od faze razvića donora eksplantata i biljne vrste (Hutchinson *et al.*, 1997; Sankhla *et al.*, 1992; Biddington *et al.*, 1992). Awadh *et al.* (2019) su pokazali da PAC indukuje regeneraciju pupoljka direktnom organogenezom iz apikalnih meristema urme. Pretpostavlja se da PAC pospešuje regeneraciju procesom organogeneze delujući na povećanje biosinteze citokinina u eksplantatima (Zhu *et al.*, 2004). Dok je egzogena GA₃ (0.5-5 mg/l) inhibirala regeneraciju adventivnih pupoljaka iz epikotila *Citrus grandis*, PAC je u znatno nižim koncentracijama povećavao regenerativni potencijal eksplantata ove biljne vrste (Tao *et al.*, 2002). Kod *Albizia julibrissin* PAC je u koncentraciji od 0.3-0.4 μM stimulisao regeneraciju pupoljaka iz hipokotila klijanaca (Sankhla *et al.*, 1993). Pozitivan efekat PAC na *de novo* organogenezu pupoljaka je pokazan kod mnogih biljnih vrsta kao što su: ananas (Escalona *et al.*, 1999), banana (Albany *et al.*, 2005) i jabuka (Kepenek & Karoglu, 2011). Smatra se da GA inhibiraju proces organogeneze inhibicijom dedifrenciacije ćelija, a da PAC sprečava inhibiciju ovog procesa.

Za razliku od toga, u slučaju somatske embriogeneze stvari stoje drugačije. Iako je generalno poznato da GA inhibiraju formiranje somatskih embriona (Fujimura & Komamine, 1975; Tisserat & Murashige, 1977a,b; Kochba *et al.*, 1978; Spiegel-Roy & Kochba, 1980; Hutchinson *et al.*, 1997; Tokuji & Kuriyama, 2003; Cheong & Pooler, 2004), postoje i primeri njegovog stimulativnog efekta kod nekoliko biljnih vrsta, uključujući i spanać (Komai *et al.*, 1996a,b; Knoll *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 1976; Lakshmi Sita *et al.*, 1979). Stoga, efekat PAC na regeneraciju somatskih embriona varira kod različitih biljnih vrsta, ali i u okviru iste vrste tokom različitih stadijuma razvića somatskih embriona (Hutchinson *et al.*, 1997; Li & Wolyn, 1995). Kod *Pelargonium hortorum* za indukciju somatskih embriona iz hipokotila klijanaca neophodno je prisustvo TDZ, međutim primena 0.1–0.5 μM PAC u medijumu za diferenciaciju je stimulisala formiranje somatskih embriona, dok je taj efekat izostao kada je PAC dodat u indukcionu medijum (Hutchinson *et al.*, 1997). Dodavanje GA₃ u indukcionu ili medijum za diferenciaciju dovelo je do inhibicije formiranja somatskih embriona. Takođe, PAC nije imao efekta tokom faze indukcije somatske embriogeneze kod *Asparagus* sp, ali je stimulisao razviće somatskih embriona u biljke (Li & Wolyn, 1997). Pošto GA povećavaju sintezu hidrolitičkih enzima koji razlažu rezervne materije tokom klijanja semena, Li i Wolyn (1997) smatraju da inhibicija GA sa

PAC može povećati nivo rezervnih materija, što može biti kritično za razviće somatskih embriona u biljke. Navedeni primeri ukazuju da uticaj PAC na somatsku embriogenezu podržava hipotezu da endogeni GA imaju inhibitornu ulogu tokom kasnijih faza razvića somatskih embriona. Međutim, pokazano je da GA mogu imati inhibitoran efekat i tokom početnih faza somatske embriogeneze. Tokom globularnog stadijuma razvića somatskih embriona šargarepe, inhibitorni efekat GA može biti poništen primenom inhibitora biosinteze GA (Tokuji & Kuriyama, 2003). Takođe, PAC u koncentraciji 0.33-3mg/l je indukovao regeneraciju i razviće somatskih embriona kod nekoliko vrsta četinara (Pullman *et al.*, 2005a). Varijabilnost u odgovoru biljaka na primenu PAC može biti u korelaciji sa nivoom endogenih GA u eksplantatima (Pullman *et al.*, 2005a). Noma *et al.* (1982) su uspostavili korelaciji između visokog nivo endogenih GA, verovatno GA₁, i smanjene sposobnosti katabolizma GA₁ sa odsustvom razvića somatskih embriona kod *Pimpinella anisum* i *Daucus carota*. Sa druge strane, povećan katabolizam GA₁ i formiranje GA₈ i drugih konjugovnih oblika GA je bilo u korelaciji sa pospešenim razvićem somatskih embriona. Da je smanjenje endogenih GA primenom inhibitora biosinteze ključno za indukciju somatske embriogeneze, pokazano je i kod *pkl* mutanta *A. thaliana*, kod kojih je povećanje katabolizma endogenih GA omogućilo dediferencijaciju ćelija korena u embriogene ćelije, što je dovelo do indukcije somatske embriogeneze (Ogas *et al.*, 1997). I zaista kod mnogih biljnih vrsta smanjenje nivoa endogenih GA primenom PAC je predstavljao okidač za indukciju somatske embriogeneze, što je potvrđeno kod: *Echinochloa* (Sankhala *et al.*, 1992), *Centaurium erythraea* (Subotić *et al.*, 2009), *Oncidium* (Chen & Chang, 2003), *Phoenix dactylifera* (Hussam *et al.*, 2015), *Pennisetum purpureum* (Rajasekaran *et al.*, 1987). Međutim, kod nekoliko biljnih vrsta je pokazano da PAC može da inhibira somatsku embriogenezu, kao kod prokelja (Biddington *et al.*, 1992), *Medicago sativa* (Ruduš *et al.*, 2002), šargarepe (Mitsubishi *et al.*, 2003) i *Medicago truncatula* (Igielski & Kępczyńska, 2017). Primena inhibitora biosinteze GA, dovela je do zaustavljanja razvića somatskih embriona šargarepe na stadijumu torpeda, dok je egzogena primena GA stimulisala ovaj proces (Mitsubishi *et al.*, 2003). Verovatno u slučaju somatske embriogeneze šargarepe, za razliku od gore pomenutih primera, povećanje nivoa endogenih GA je bilo ključno za indukciju razvića somatskih embriona. Takođe, pokazano je da dolazi do povećanja ekspresije *Giberelin-3-oksidade* (GA3-ox) tokom svih stadijuma razvića somatskih embriona, dok se nivo ekspresije *Giberelin-20-oksidade* (GA20-ox) i GA2-ox2 nije menjao, što ide u prilog činjenici da povećanje biosinteze GA predstavlja neki vid stimulusa u indukciji somatske embriogeneze šargarepe (Mitsubishi *et al.*, 2003). Povećanje ekspresije *MtGA3-ox* gena je detektovano tokom indukcije somatske embriogeneze iz listova *Medicago truncatula*, dok je primena 0.5-10 μM PAC inhibirala ovaj proces (Igielski & Kępczyńska, 2017). Međutim, u ovom slučaju egzogena primena GA₃ ne samo da nije poništila efekat PAC, već je u koncentraciji od 0.5 μM takođe inhibirala indukciju somatske embriogeneze. Autori smatraju da je endogeni nivo GA ključan i da u nekim slučajevima može biti dovoljan za proliferaciju embriogenih kalusa i razvića somatskih embriona, te i da nije potrebna primena egzogene GA₃, pogotovu kod genotipova koji poseduju visok embriogeni potencijal (Igielski & Kępczyńska, 2017). Do sada nema literaturnih podataka o uticaju bilo kog inhibitora biosinteze GA na indukciju somatske embriogeneze spanaća.

Svetlost

Svetlost je jedan od važnih faktora koji kontroliše rastenje i razviće biljaka, utiče na morfogenezu, metabolizam, kao i sadržaj hlorofila u biljnim ćelijama, tkivima i kulturama organa gajenim u uslovima *in vitro* (Dou *et al.*, 2017). Svetlost takođe može da utiče na osetljivost tkiva prema BRR, kao i na nivo endogenih hormona (García-Martínez & Gil, 2001; Halliday *et al.*, 2009; Stavang *et al.*, 2007). Uticaj svetlosti na regeneraciju kod biljaka u uslovima *in vitro* može se razlikovati u zavisnosti od biljne vrste, sorte i izbora eksplantata (Economou & Read, 1987). Kod

mnogih biljnih vrsta svetlost je bila neophodna za indukciju *de novo* regeneracije, što je pokazano kod *Petunia hybrida* (Reuveni & Evenor, 2007), *Azadirachta indica* (Saitou *et al.*, 1992), *Carica papaya* (Ascencio-Cabral *et al.*, 2008), *Citrus clementina* (Germanà *et al.*, 2005) i *Phaseolus vulgaris* (Cabrera-Ponce *et al.*, 2015). Kod *C. papaya* pored stimulativnog uticaja svetlosti na indukciju somatske embriogeneze, pokazan je i pozitivan efekat svetlosti na klijanje i dalje razviće somatskih embriona (Ascencio-Cabral *et al.*, 2008). Nasuprot tome, svetlost je imala negativan uticaj na direktnu somatsku embriogenezu kod *Phalaenopsis sp.* dovodeći do nekroze somatskih embriona i njihovog abnormalnog razvića (Gow *et al.*, 2009). Kod *Aesculus flava*, svetlost je skoro potpuno inhibirala formiranje kalusa iz filamenata prašnika i regeneraciju somatskih embriona (Zdravković-Korać *et al.*, 2019). Kod pojedinih biljnih vrsta regeneracija nije bila u potpunosti inhibirana pod uticajm svetlosti, već je ona imala samo negativan efekat prvih nekoliko sati tokom indukcije *de novo* regeneracije (Kanwar *et al.*, 2010; Nameth *et al.*, 2013; Muktadir *et al.*, 2016; Talla *et al.*, 2018). Pa je tako, pretretman eksplantata u mraku, u trajanju samo 2-6 h, povećao efikasnost regeneracije pupoljaka iz kotiledona *A. thaliana* (Nameth *et al.*, 2013).

Periodična primena svetlosti (fotoperiod) na biljke gajene u uslovima *in vitro*, pokazala se veoma važnom, jer može povećati potencijal regeneracije kod mnogih biljnih vrsta. Uslovi dugog dana (DD, 16h svetlosti) su imali stimulativan uticaj na produkciju embriogenog kalusa, regeneraciju protoplasta i pupoljaka kod mnogih biljnih vrsta (Leshem *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2001; Rinaldi, 1999), dok su za indukciju regeneracije pupoljaka kod *Piper nigrum* (Ahmad *et al.*, 2014) i regeneraciju protoplasta kod *Solanum pennellii* (Hassanpour-Estahbanati & Demarly, 1985) optimalni bili uslovi kratkog dana (KD, 8h svetlosti).

Pored uticaja fotoperioda, za indukciju regeneracije biljaka veoma je važan i intenzitet svetlosti. Dok je kod pojedinih biljnih vrsta, kao što je *Gossypium hirsutum* za efikasnu regeneraciju bio potreban veoma nizak intenzitet svetlosti ($5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, Gupta *et al.*, 2000), regeneracija pupoljaka kod *Linum usitatissimum* je bila efikasna tek pri intenzitetu svetlosti od $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Caillot *et al.*, 2009). Ipak, kod većine biljnih vrsta optimalni intenzitet svetlosti za efikasnu indukciju regeneracije je $45\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Farhadi *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019).

U poslednjih nekoliko godina, veliki broj publikacija ukazuje i na važnost izvora svetlosti za rastenje i razviće, ali i morfogenezu biljaka u uslovima *in vitro*, ističući velike prednosti korišćenja svetlosti koje emituju *Light Emitting Diode* (LED) u poređenje sa konvencionalnim fluorescentnim lampama (FL) (Dutta Gupta & Jatothu, 2013; Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2016; Dutta Gupta & Agarwal, 2017; Bello Bello, 2017; Xu *et al.*, 2020). Prednosti korišćenja LED lampi u kulturi *in vitro* se ogledaju u emisiji uskog talasnog opsega svetlosti i dinamičkoj kontroli intenziteta svetlosti čime se omogućava prilagođavanje spektralnog kvaliteta specifičnom fiziološkom procesu kao i biljnoj vrsti (Dutta Gupta & Jatothu, 2013). Suprotno tome, novija istraživanja pokazuju da dobar deo spektra svetlosti koje emituju FL lampe nije upotrebljiv za biljne kulture (Dutta Gupta & Jatothu, 2013). Takođe, LED lampe precizno pretvaraju električnu energiju u fotone određene talasne dužine i gustine fluksa uz zanemarljivo oslobađanje toplote, što je suprotno od FL lampi koje dosta energije troše na emisiju toplote (Dutta Gupta & Agarwal, 2017). Interakcija između fotoreceptora koji detektuju svetlost iz crvenog i plavog dela spektra je okarakterisana kao najvažnija u odgovoru biljke na okolne svetlosne uslove (Franklin & Whitlam, 2004). Smatra se da je kontrola i optimizacija tih uslova značajno olakšana upotrebom LED lampi. Imajući u vidu sve navedene činjenice, LED lampe predstavljaju idealan izvor svetlosti uskog opsega talasne dužine koja je neophodna za indukciju organogeneze i somatske embriogeneze kod mnogih biljnih vrsta. Povećanje efikasnosti regeneracije putem organogeneze, ali i povećavanje stope preživljavanja biljaka u uslovima *ex vitro* i njihove biomase, pod uticajem LED svetlosti je pokazano kod mnogih biljnih vrsta (Hahn *et al.*, 2000; Nhut *et*

al., 2003; Jao *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010; Dutta Gupta & Sahoo, 2015). Pozitivan uticaj LED svetlosti na indukciju somatske embriogeneze je uočen kod nekoliko biljnih vrsta, kao što su *Doritanaeopsis sp.* (Park *et al.*, 2010), *Peucedanum japonicum* (Chen *et al.*, 2016a) i papaje (Almeida *et al.*, 2019).

Stres

Stres predstavlja važan faktor u indukciji somatske embriogeneze. Osmotski stres, stres izazvan teškim metalima, visioaka i niska temperatura, nedostatak kiseonika i UV zračenje stimulišu prelazak somatskih ćelija iz vegetativnog na embrionalni program razvića. (Zavattieri *et al.*, 2010; Nic-Can *et al.*, 2016; Ochatt, 2017). Kakav će biti odgovor biljnih ćelija na stresne uslove zavisiće od nivoa stresa i fiziološkog stanja ćelije (Ikeda-Iwai *et al.*, 2003; Fehér, 2015). Visok intenzitet stresnih uslova može da dovede do smrti ćelija ako one nisu u stanju da tolerišu takav nivo stresa. Drugi efekti stresa podrazumevaju pokretanje raznovrsnih mehanizama adaptacija koji dovode do reprogramiranja ekspresije gena i promena ćelija na fiziološkom i metaboličkom nivou (Pasternak *et al.*, 2002). Smatra se da somatska embriogeneza predstavlja jedan od mehanizama adaptacije biljaka na stresne uslove (Dudits *et al.*, 1991; Desjardins *et al.*, 2009).

Sami uslovi kultivisanja *in vitro* predstavljaju neobičnu kombinaciju faktora koji su stresni za biljne ćelije. Sterilizacija i uvođenje u kulturu primarnih eksplantata uključuje oksidativni stres pri sterilizaciji natrijum hipohloritom, stres povređivanja pri izolaciji eksplantata i osmotski stres usled kultivacije eksplantata na medijumu koji sadrži osmotski aktivne supstance (Nolan *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2014a). Takođe, prisustvo visokih koncentracija auksina u medijumu tokom indukcije somatske embriogeneze predstavlja vrlo stresne uslove za biljne ćelije. Primena visoke koncentracije 2,4-D u kombinaciji sa natrijom-hloridom (NaCl) ili sorbitolom efikasno indukuje somatsku embriogenezu kod *Cattleya maxim* (Cueva Agila *et al.*, 2015). Kod nekih biljnih vrsta različiti stresni faktori indukuju somatsku embriogenezu i bez prisustva BRR. Na primer, somatska embriogeneza šargarepe se efikasno indukuju primenom višestrukih faktora stresa, jonima teških metala, osmotskim ili toplotnim stresom (Kamada *et al.*, 1994), dok je pretretman izdanaka *Pinus patula* niskim temperaturama (2°C) bio dovoljan da indukuje razviće embriogenih ćelija (Malabadi & Van Staden, 2006). Stresni faktori pored toga što promovišu dediferencijaciju somatskih ćelija, mogu i da utiču na razviće somatskih embriona. Visoka koncentracija betaina u medijumu, koji deluje kao osmotski faktor, stimulišala je razviće somatskih embriona kod *Camellia sinensis* (Akula *et al.*, 2000). Kod pojedinih vrsta četinara je pokazano da je polietilen glikol (PEG) u kombinaciji sa ABA imao pozitivno dejstvo na sazrevanje somatskih embriona (Stasolla *et al.*, 2002; Salo *et al.*, 2016).

Korelacija između somatske embriogeneze i pojave reaktivnih oblika kiseonika (*Reactive Oxygen Species* - ROS) je uočena kod mnogih biljnih vrsta, što i nije čudno jer se oksidativni stres javlja kao posledica delovanja mnogih primarnih stresora (suša, ekstremne temperature, visok intenzitet svetlosti, prisustvo soli u zemljištu) (Vranová *et al.*, 2002; Blazquez *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2019; Prudente *et al.*, 2019). Egzogeno primena ROS u niskim koncentracijama efikasno je indukovala somatsku embriogenezu kod nekoliko biljnih vrsta npr. *Lycium barbarum*, *A. thaliana* i duvana (Kairong *et al.*, 2002; Rose *et al.*, 2010), dok su ROS u visokim koncentracijama imali inhibitoran efekat na formiranje embriogenih ćelija (Papadakis *et al.*, 2001). Formiranje ROS tokom indukcije somatske embriogeneze dovodi do povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima. Kultivacija protoplasta lucerke uz dodatak 1 mM Fe-EDTA izazvala je povećanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX) već posle jednog dana, kao odgovor ćelija na povećanu produkciju vodonik-peroksida (H₂O₂) (Pasternak *et al.*, 2002). Slični rezultati su dobijeni primenom drugih jedinjenja koja indukuju formiranje ROS u ćelijama, kao što su bakar (Pasternak *et al.*, 2002), kadmijum (Patnaik *et*

al., 2005), hemoglobin (Ganesan & Jayabalan, 2004) i PEG (Heringer *et al.*, 2013). 2,4-D povećava nivo superoksid radikala ($\bullet\text{O}_2^-$) (Romero-Puertas *et al.*, 2004), koga zatim superoksid dismutaza (SOD) konvertuje u H_2O_2 , a katalaze (CAT) i peroksidaze (POD) prevode u H_2O . Difenilen jodonium (DPI), inhibitor nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaze (NADPH), koji blokira oslobađanje ($\bullet\text{O}_2^-$), izazvao je i sniženje aktivnosti antioksidativnih enzima i smanjenje embriogenog potencijala eksplantata listova *M. truncatula* (Orłowska & Kępczyńska, 2020a), ukazujući da je neophodna odgovarajuća koncentracija ROS za indukciju embriogeneze i za regulaciju ekspresije ključnih gena za pokretanje somatske embriogeneze, koji uključuju gene *Polycomb* i *Trithorax* grupe, *LEC1*, *LIL*, *WUS*, *WOX5* i *STM* (Orłowska & Kępczyńska, 2020a,b). Povećan nivo ROS i antioksidativnih enzima je detektovan i pri indukciji somatske embriogeneze inhibitorima enzima koji vrše različite modifikacije hromatina (Wang *et al.*, 2016; Wójcikowska *et al.*, 2018). Ovaj efekat je poništen u prisustvu tiouree, koja ima snažno antioksidativno dejstvo i utiče na smanjenje H_2O_2 (Wang *et al.*, 2016). Redukovani glutation (GSH) može da indukuje somatsku embriogenezu i bez prisustva auksina povećanjem ekspresije *YUCCA* gena i akumulacijom endogenih indolnih jedinjenja (Kudeřko & Gaj, 2019). Uočeno je da je ekspresija gena koji imaju ulogu u odgovoru na stres značajno veća kod somatskih nego kod zigotskih embriona (Jin *et al.*, 2014a). Smatra se da prisustvo ROS reguliše balans između proliferacije i diferencijacije ćelija (Tsukagoshi *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2014a) i da je povećana aktivnost SOD, APX i CAT u embriogenim kulturama *Catharanthus roseus* omogućila njihovo održavanje tokom 14 godina (Gulzar *et al.*, 2021).

Tokom indukcije somatske embriogeneze dolazi do velikih promena u ekspresiji gena koji odgovaraju na stres npr. gena koji kodiraju kinaze i enzime uključene u biosintezu ABA, jasmonata i salicilne kiseline, međutim tačan mehanizam delovanja stresnih faktora još uvek nije poznat (Ruduš *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2014b; Thibaud-Nissen *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2007 Nic-Can *et al.*, 2016; Nowak & Gaj, 2016). Moguće je da postoji zajednički signalni put, ali da je on modulisan interakcijom različitih stresnih faktora koji stimulišu embrionalno razviće u somatskim ćelijama.

pH medijuma

Korelacija između povećanja pH vrednosti i indukcije somatske embriogeneze je prvi put pokazana u embriogenim ćelijama kalusa lucerke (Schaefer, 1985). Kasnije je pokazano da se formiranje proembrionalne mase kod šargarepe uspostavlja usled alkalizacije ćelija koju izaziva dodavanje amonijum hlorida (NH_4Cl) uz paralelno smanjenje pH medijuma (Smith & Krikorian, 1990a, b). Sa druge strane, primena pufera 2-(*N*-morfolino) etansulfonske kiseline (MES) je dovela do gubitka embriogenog kapaciteta čak i u prisustvu 2,4-D, što ukazuje da nije važna samo vrednost intercelularnog pH, već i ekstracelularnog koji dovodi do uspostavljanja gradijenta protona na ćelijskoj membrani (Pasternak *et al.*, 2002). Uloga pH u indukciji i razviću somatskih embriona se ogleda u stimulaciji ćelijskih deoba i pokretanju ćelijskog ciklusa, ali je i pokazano da povećanje pH vrednosti u ćelijama može da poveća njihovu osetljivost prema BRR (Santarem *et al.*, 1997).

Hranljivi sastojci u medijumu

Za uspešnu indukciju *de novo* regeneracije i efikasno rastenje i razviće biljaka u uslovima *in vitro* neophodno je za svaku biljnu vrstu empirijski odrediti tip i koncentraciju hranljivih sastojaka (Birhman *et al.*, 1994; Dahleen, 1995; Komai *et al.*, 1996a). Svaki medijum sadrži mineralni rastvor kojeg čini kombinacija mikro i makro elemenata, koji se najčešće koriste kao formulacije koje su optimizovane za neku biljnu vrstu, poput Murashige & Skoog (1962, MS) mineralnog rastvora. MS mineralni rastvor je korišćen u više od polovine studija indukcije somatske embriogeneze kod različitih biljnih vrsta (Carman *et al.*, 1987; Preece, 1995; Verma & Mathur, 2011). Osim ove, koristi

se i niz drugih formulacija mineralnog rastvora, poput B5 (Gamborg *et al.*, 1968), White (White, 1943), Nitsch (Nitsch, 1969), SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) i dr.

Prisustvo različitih izvora azota u medijumu u vidu neorganskog (nitrata i amonijuma) ili organskog (amino kiselina) značajno utiče na indukciju somatske embriogeneze. Kod mnogih biljnih vrsta je pokazano da različite koncentracije amonijuma (NH_4^+) i nitrata (NO_3) ali i njihov odnos imaju ulogu u indukciji i razviću somatskih embriona (Grimes *et al.*, 1990; Choi *et al.*, 1998; Kothari *et al.*, 2004). Dodavanje NH_4^+ i NO_3 u odnosu 1:1 je uticalo na efikasnu indukciju somatske embriogeneze kod pirinča, povećavajući osetljivost tkiva na auksine (Kothari *et al.*, 2004). U slučaju somatske embriogeneze šargarepe i bundeve primena NH_4^+ kao jedinog izvora azota je stimulisala ovoj proces i bez primene egzogenih BRR (Leljak & Jelaska, 1995; Smith & Krikorian, 1989, 1991). Međutim, u oba slučaja proces somatske embriogeneze je bio zaustavljen na stadijumu proembriogene mase ćelija, a za dalje razviće somatskih embriona bilo je neophodno prisustvo NO_3 (Higashi *et al.*, 1996; Leljak-Levanic *et al.*, 2004a). Zaustavljanje razvića embriogenih kultura se može pripisati negativnom efektu NH_4^+ kao što je toksičnost prema biljnom tkivu i acidifikacija medijuma (Smith & Krikorian, 1992). Ipak indukcija somatske embriogeneze kod bundeve primenom NH_4^+ u poređenju sa 2,4-D dovodi do formiranja embriogenih kultura koje su visoko sinhronizovane i imaju veći potencijal za regeneraciju (Leljak-Levanic *et al.*, 2004a,b). Pored neorganskog, dodavanje organskog azota u medijum u vidu aminokiselina, kao što su glutamin, alanin, arginin i prolin efikasno doprinosi indukciji somatske embriogeneze (Kim & Moon, 2007; Gerdakaneh *et al.*, 2011; Nieves *et al.*, 2008). Kazein-hidrozoalat i glutamin predstavljaju najčešće korišćene izvore organskog azota koji imaju pozitivan efekat tokom različitih stadijuma razvića somatskih embriona (Bozhkov *et al.*, 1993; Pescador *et al.*, 2012b). Za efikasnu indukciju somatske embriogeneze kod nekih biljnih vrsta je neophodna kombinacija organskog i neorganskog izvora azota. Glutamina u kombinaciji sa NH_4^+ i NO_3 je stimulisao razviće proembrionalne mase kod *Picea abies*, dok je taj efekat izostao kada je u medijumu bio prisutan samo neorganski izvor azota (Carlsson *et al.*, 2017). Tokom klijanja somatskih embriona *P. abies*, čak 50% asimilovanog azota je poticao iz glutamina (Carlsson *et al.*, 2019).

Primena različitih tipova mikronutrijenata, npr. bakara i cinka u obliku sulfata, u optimalnim koncentracijama je imala stimulativan efekat na razviće kalusa i indukciju somatske embriogeneze kod mnogih biljnih vrsta, dok u visokim koncentracijama mogu biti toksični za biljne ćelije (Dahleen, 1995; Sahrawat & Chand, 1999; Tahiliani & Kothari, 2004; Sing *et al.*, 2017; Alam *et al.*, 2020). Efekat bakra na regeneraciju biljaka se može pripisati njegovoj ulozi kao kofaktora ključnih enzima koji učestvuju u transportnom lancu elektrona, biosintezi ugljenih hidrata i metabolizmu polifenola, dok cink modulise ekspresiju mnogih gena koji odgovaraju na stres i učestvuje u sintezi proteina (Cakmak, 2000). Slično tome, prisustvo bora u vidu borne kiseline u medijumu je indukovalo embrionalno razviće somatskih ćelija kod pirinča (Sahasrabudhe *et al.*, 1999) i papaje (Renukdas *et al.*, 2003). Pokazano je da bor stimuliše aktivnost transkripcionih faktora koji utiču na nivo endogenih hormona i sintezu proteina koji su u korelaciji sa sticanjem embriogenog potencijala (Pandey *et al.*, 2012).

Šećeri predstavljaju obavezan sastojak svih medijuma za kultivaciju biljaka u uslovima *in vitro*, jer obezbeđuju ugljenik i energiju (Gaj, 2004) Prisustvo šećera u medijumu stvara odgovarajuće osmotske uslove za rastenje i razviće, a pored toga je pokazano da oni mogu delovati i kao signalni molekuli (Eveland & Jackson, 2012; Li & Sheen, 2016). Pokazano je da različiti tipovi i koncentracije šećera imaju ulogu u indukciji somatske embriogeneze (Barro *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1992; Oldach *et al.*, 2001). Za indukciju i razviće somatskih embriona najčešće se koristi 1-6 % saharoza, mada koncentracija može varirati u zavisnosti od biljne vrste i tipa ćelije (Lipavská & Konrádová, 2004). Iako se saharoza brzo hidrolizuje u medijumu na fruktozu i glukozu, smatra se da novonastali odnos

heksoza predstavlja signal za indukciju i razviće somatskih embriona, stimulišući sintezu skroba i rezervnih proteina (Iraqi & Tremblay, 2001a, b). Takođe je pokazano da saharoza može da poveća osetljivost tkiva prema BRR, ali i da utiče na nivo endogenih auksina i citokinina (Charriere *et al.*, 1999). Navedeni efekat se može pripisati ulozi saharoze kao signalnog molekula koji se ukršta sa signalnim putevima mnogih hormona, modulišući ekspresiju gena uključenih u biosintezu i metabolizam hormona (Leon & Sheen, 2003; Dobrenel *et al.*, 2013). Korišćenje drugih tipova šećera (glukoze, fruktuze, maltoze, manitola, celobioze, sorbitola) se pokazalo manje efikasnim u indukciji somatske embriogeneze u poređenju sa saharozom. Kod pojedinih biljnih vrsta npr. krastavca i dinje za indukciju i razviće somatskih embriona bila je neophodna kombinacija različitih tipova šećera (Lou & Kako, 1995; Nakagawa *et al.*, 2001).

U medijum za kultivaciju biljaka često se dodaju različiti vitamini, koji imaju ulogu enzimskih kofaktora u mnogim metaboličkim reakcijama i na taj način stimulišu rastenje biljaka u uslovima *in vitro*, ali u određenim kombinacijama stimulišu i regeneraciju kod mnogih biljnih vrsta (Benson, 2000). Najčešće korišćeni vitamini u kulturi biljnih tkiva su tiamin (vitamin B1), niacin (nikotinska kiselina) i piridoksin (vitamin B6) (Dodds & Roberts, 1995). Vitamin B1 se smatra esencijalnim sastojkom skoro svih formulacija medijuma za kultivaciju biljaka, jer je on veoma važan kofaktor u metabolizmu šećera (Fehér *et al.*, 2003; Goyer, 2010). Pored toga, pokazana je uloga vitamin B1 u regulaciji ekspresije gena tokom reproduktivne faze ćelija (Goyer, 2010), pa nije začuđujuće što je kod pojedinih biljnih vrsta značajno uticao na povećanje embriogenog potencijala (Al-Khayri, 2001; Reyes-Díaz *et al.*, 2020). Iako se u manjoj meri koriste askorbinska kiselina (vitamin C), biotin (vitamin H), pantotenska kiselina (vitamin B5), riboflavin (vitamin B2) i tokoferol (vitamin E) (Dodds & Roberts, 1995), kod pojedinih biljnih vrsta pokazano je njihovo stimulativno dejstvo na indukciju somatske embriogeneze. Vitamin B12 i E su indukovali somatsku embriogenezu iz zrelih zigotskih embriona kod četinara (Pullman *et al.*, 2005b), dok je vitamin B2 stimulisao razviće embriogenog kalusa kod *Zoysia japonica* (Asamo *et al.*, 1996). Zanimljivo je da je vitamin C bio neophodan sastojak u medijumu za regeneraciju *Acacia mangium* (Xie & Hong, 2001) i *Sapindus trifoliatus* (Asthana *et al.*, 2017), dok je inhibirao razviće somatskih embriona kod *A.thaliana* (Becker *et al.*, 2014).

Na povećanje efikasnosti somatske embriogeneze kod nekih biljnih vrsta pozitivno je uticalo dodavanje organskih ekstrakata (slad, homogenat banane, kokosovo mleko, ekstrakti krompira, kukuruza, papaje) u medijum (Ichihashi & Islam, 1999; Islam *et al.*, 2003). Kokosovo mleko indukuje somatsku embriogenezu kod papaje, dok slad pozitivno utiče na razviće i klijanje somatskih embriona citrusa (Carimi *et al.*, 1998,1999). U poređenju sa primenom BRR, pokazano je da organski ekstrakti ne dovode do pojave mutacija, čime se smanjuje šansa za pojavu somaklonalnog variranja (Rahman *et al.*, 2004). Ipak, organski ekstrakti se ređe koriste zbog složenog i promenljivog sastava, usled čega se ne može utvrditi koja je komponenta odgovorna za indukciju somatske embriogeneze.

1.2. Giberelini

Giberelini (GA) predstavljaju važnu klasu biljnih hormona, koji su u fokusu istraživanja proteklih osamdeset godina. Termin „giberelin“ je uveden 1935. godine za supstancu koju proizvodi gljiva *Gibberella fujikuroi*, koja izaziva simptome prekomernog rasta kod pirinča (Yabuta, 1935). Kasnije je pokazano da ovu supstancu čini mešavina giberelina od kojih su GA₁ i GA₃ biološki aktivni (Takahashi *et al.*, 1955). Ključne uloge GA u rasteњу i razviću biljaka su otkrivene nakon proučavanja mutanata deficitarnih za biosintezu GA, koji su nižeg rasta nego divlji tip. Pošto su se patuljasti mutanti graška izduživali posle egzogene primene GA₃ izolovane iz *G. fujikuroi*, pretpostavljeno je da

je GA prirodni faktor rasta koji nedostaje kod patuljastih mutanata graška (Brian & Hemming, 1955). Ova pretpostavka je potvrđena godinu dana kasnije kada je otkriveno da biljni ekstrakti takođe mogu da stimulišu rast izdanaka kod patuljastih mutanata (Radley, 1956). Primenom fizičko-hemijskih metoda je otkriveno da su GA zapanjujuće velika grupa prirodnih proizvoda sa preko 130 različitih jedinjenja prisutnih kod bakterija, gljiva i viših biljaka (Hedden, 2016). Međutim, samo nekoliko GA poseduje biološku aktivnost, zbog čega imaju ulogu hormona. Među glavne bioaktivne gibereline spadaju GA₁, GA₃, GA₄, i GA₇ (Yamaguchi, 2008). Nakon otkrića velikog strukturnog diverziteta GA bilo je jasno da oni nisu neophodni samo za izduživanje stabiljke kod biljaka, već učestvuju u gotovo svim razvojnim procesima u biljci kao značajan činilac u kompleksnoj interakciji hormona. Pa tako, GA imaju ulogu u kljijanju semena, sazrevanju polena, razviću trihoma, ekspanziji listova i u indukciji cvetanja (Anderson *et al.*, 2001; Sauter *et al.*, 1995; Hedden & Sponsel, 2015; Hedden, 2016; Plackett *et al.*, 2011; Sakamoto *et al.*, 2004; Plackett & Wilson, 2016).

1.2.1. Biosinteza i metabolizam GA

Biosintetički put GA je veoma kompleksan, međutim zahvaljujući mnogobrojnim biohemijskim i genetičkim studijama koje su vršene na višim biljkama, on je danas u velikoj meri poznat. Mnogi geni koji kodiraju enzime uključene u biosintezu GA su identifikovani i potvrđena im je funkcija. Aktivnost svakog od tih enzima je precizno prostorno i vremenski regulisana (Han & Zhu, 2011; Hedden & Thomas, 2012; Hedden, 2016; Yamaguchi, 2008; Binenbaum *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2017).

GA spadaju u grupu diterpenoidnih jedinjenja sa 19 ili 20 ugljenikovih atoma, koji grade tetracikličan skelet od dva šestočlana i dva petočlana prstena. Mogu se naći u slobodnom ili konjugovanom obliku. U konjugovane GA spadaju oni koji su eterskom ili esterskom vezom vezani za glukozu i najčešće nemaju biološku aktivnost u biljkama (Rademacher, 1992). Sa druge strane, da bi bili biološki aktivni, GA moraju da poseduju intaktan tetraciklični skelet prstenova, karboksilnu grupu na C7 atomu, i petočlani laktonski prsten. Ostali GA koji se nalaze u biljkama su prekursori ili proizvodi deaktivacije aktivnih GA (Rademacher, 1992).

Biosintetički put GA se generalno može podeliti u tri faze, koje zahtevaju aktivnosti tri različite grupe enzima lociranih u različitim ćelijskim odeljcima (Sl. 1) (Olszewski *et al.*, 2002; Sponsel & Hedden, 2004; Hedden & Thomas, 2012). Prva faza u biosintetičkom putu GA obuhvata ciklizaciju geranilgeranil difosfata (GGPP), prekursora svih diterpenoida, u *ent*-kauren - prvi stabilni i specifični prekursor GA (Hedden & Kamiya, 1997; Sponsel, 1995). Ova reakcija se odvija u plastidima i katalizovana je enzimima *ent*-kopalil-difosfat sintazom (CPS) i sintazom *ent*-kaurena (KS) (Hedden & Kamiya, 1997; Hedden & Phillips, 2000; Hershey *et al.*, 2014; Salazar-Cerezo *et al.*, 2018).

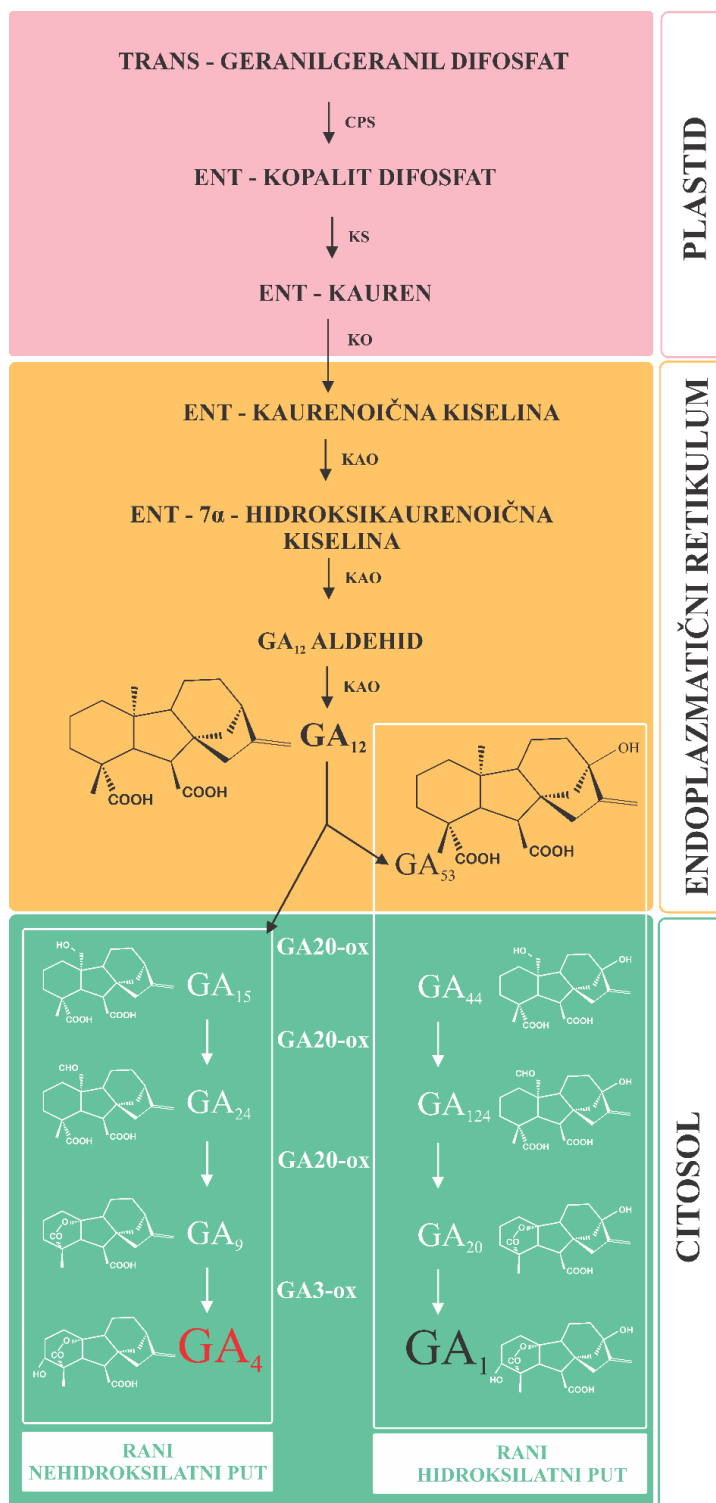
Druga faza biosinteze GA se odvija u endoplazmatičnom retikulumu i katalizovana je enzimima koji pripadaju tipu monooksigenaza zavisnih od citohroma P-450. U ovoj fazi enzim *ent*-kauren oksidaza (KO) katalizuje oksidaciju na C-19 atomu, prilikom čega nastaje *ent*-kaurenoična kiselina koja se dalje konvertuje u GA₁₂ zahvaljujući aktivnosti enzima oksidaze *ent*-kaurenoične kiseline (KAO) (Helliwell *et al.*, 1998, 1999, 2001; Ko *et al.*, 2008; Morrone *et al.*, 2010). GA₁₂ predstavlja prvo jedinjenje sa giberelinskim prstenom od kojeg postaju svi ostali GA (Sl. 1) (Hedden & Kamiya, 1997). Poznato je da su prethodne faze koje dovode do formiranja GA₁₂, u biosintetskom putu GA konzervirane kod viših biljaka. Nasuprot tome, u trećoj fazi biosinteze GA dolazi do račvanja puteva u kojima se od GA₁₂ preko različitih intermedijera formiraju biološki aktivni GA zahvaljujući aktivnosti GA₂₀-oksidaze (GA₂₀-ox) i GA₃-oksidaze (GA₃-ox, Sl. 1). GA₂₀-ox i GA₃-ox pripadaju multifunkcionalnim solubilnim dioksigenazama zavisnim od 2-oksoglutarata, koje

su prisutne u citosolu i poseduju veoma raširenu specifičnost supstrata (Chiang *et al.*, 1995; Plackett *et al.*, 2012; Sponsel *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1995). Prema tome, GA₁₂ predstavlja mesto račvanja dva paralelna puta u biosintezi GA i to u zavisnosti od mesta hidroksilacije. Tako hidroksilacijom 3β-ugljenika nastaje bioaktivni GA₄, dok hidroksilacijom 13β-ugljenika nastaje bioaktivni GA₁ (Sl. 1).

Kod većine viših biljaka, uključujući i spanać, većina endogenih GA potiče iz biosintetskog puta 13-hidroksilovanih GA (Talon *et al.*, 1991a; Graebe, 1987). Smatra se da u ovom putu GA₂₀-ox katalizuje seriju oksidacija od GA₁₂ do GA₂₀, dok u završnom koraku biosinteze učestvuje GA₃-ox koja katalizuje hidroksilaciju na C-3β atomu GA₂₀, pri čemu nastaje GA₁. Mutacija u koraku 3-β-hidroksilacije blokira prelaz GA₂₀ u GA₁. Ova pojava je ujedno pokazala da je u slučaju spanaća GA₁ prvi GA aktivan *per se*, dok su ostali prekursori neaktivni metaboliti (Hedden, 1990; Nakayama *et al.*, 1990). Sa druge strane hidroksilacija C-2 atoma ugljenika dovodi do inaktivacije GA. Ovu reakciju katalizuje GA₂-oksidaza (GA₂-ox). Na ovaj način aktivni GA₁ i GA₄ prelaze u neaktivne GA₈ i GA₃₄ (Coles *et al.*, 1999). Generalno, većina GA se u biljkama nalazi u neaktivnom obliku, što im omogućava da na brz način regulišu nivo bioaktivnih GA, što je od izuzetnog značaja za njihovo uspešno rastenje i razviće i njegovo usklađivanje sa uslovima u okruženju (Gao *et al.*, 2017).

Biljka sintetiše GA u tkivima koja aktivno rastu, kao što su apikalni delovi stabla, mladi listovi, koreni, nezrela semena i plodovi (Jones & Phillips, 1966; Kobayashi *et al.*, 1988; Potts, 1982; Silverstone *et al.*, 1997; Kaneko *et al.*, 2003). Takođe, i u potpuno razvijenim tkivima, kao što su na primer listovi, odvija se biosinteza GA, mada je kod graška pokazano da oni sadrže manji nivo bioaktivnih GA, što je posledica visoke stope inaktivacije 2-β hidroksilacijom (Ross *et al.*, 2003). Na osnovu distribucije transkripata gena za biosintezu GA u korenu *A. thaliana*, pokazano je da su meristem i zona izduživanja korena glavna mesta biosinteze GA, dok se njihova inaktivacija odvija u zreлом korenu (Dugardeyn *et al.*, 2008). Pored tkiva koja aktivno rastu, prisustvo GA je detektovano i u ksilemu i floemu, što ukazuje da se oni u biljkama mogu transportovati u svim pravcima i na velikim udaljenostima (Hoad, 1995; Eriksson *et al.*, 2006).

Enzime koji su uključeni u rane faze biosinteze GA najčešće kodira jedan gen ili mala familija gena (Hedden & Thomas, 2012; Hedden, 2016; Gao *et al.*, 2017). Iako je kod mnogih biljnih vrsta prisutno više homolognih gena koji kodiraju isti enzim, najčešće produktat samo jednog od tih gena učestvuje u biosintezi GA. Na primer, familije gena kod prinča, *OsCPS* i *OsKS*, sastoje se od 3 odnosno 11 gena, ali samo *OsCPS1* i *OsKS1* učestvuju u sintezi *ent*-kaurena (Grennan, 2006). Prema tome, genetička kontrola ranih faza u biosintezi GA je najverovatnije konzervisana kod različitih biljnih vrsta.



Slika 1. Biosintetski put giberelina (GA). CPS: *ent*-kopalil difosfat sintaza, KS: sintaza *ent*-kaurena, KO: *ent*-kauren oksidaza, KAO: sintaza *ent*-kaurenoične kiseline, GA20-ox: GA20-oksidaza, GA3-ox: GA3-oksidaza, GA2-ox: GA2-oksidaza. Modifikovano prema Binenbaum *et al.* (2018).

Za razliku od enzima koji katalizuju rane stupnjeve biosinteze GA, višočlane familije gena kodiraju enzime koji katalizuju završne korake u biosintezi GA. Pa tako, familije gena kod pirinča se sastoje od 8 *GA20-ox*, 2 *GA3-ox* i 11 *GA2-ox* gena (Sakamoto *et al.*, 2004); *A. thaliana* poseduje 5 *GA20-ox*, 4 *GA3-ox* i 8 *GA2-ox* gena (Rieu *et al.*, 2008), a soja sadrži 8 *GA20-ox*, 6 *GA3-ox* i 10 *GA2-ox* gena (Han & Zhu, 2011). Svaki od tih gena u okviru familija poseduje specifičan obrazac ekspresije na nivou tkiva, organa i u različitim fazama razvića biljaka (Han & Zhu, 2011; Mitchum *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008; Plackett *et al.*, 2012; Rieu *et al.*, 2008; Pimenta-Lange *et al.*, 2013; Binenbaum *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019b). Na primer, kod *A. thaliana* je pokazano da je ekspresija *AtGA20-ox1* najveća u mladom vegetativnom tkivu koje se izdužuje, dok je ekspresija *AtGA20-ox2* i *AtGA20-ox3* najveća u cvetovima (Dugardeyn *et al.*, 2008). Za razliku od toga, kod krastavca ekspresija *GA20-ox1* je najveća u korenu, što ukazuje da ovaj gen može imati različite funkcije kod različitih biljnih vrsta (Sun *et al.*, 2018). Ekspresija *AtGA3-ox1* je relativno visoka tokom razvića u svim biljnim organima, osim u semenima koja klijaju. Sa druge strane, ekspresija *AtGA3-ox2* je najveća tokom klijanja semena, dok se *AtGA3-ox3* i *AtGA3-ox4* ekspimiraju u cvetovima (Hu *et al.*, 2008). *AtGA2-ox* se eksprimira u svim delovima biljke, ali je interesantno da je ekspresija *AtGA2-ox2* i *AtGA2-ox6* najveća u korenu (Dugardeyn *et al.*, 2008). Rezultati *Southern blot* hibridizacije ukazuju na postojanje samo jednog gena koji kodira *GA20-ox* kod spanaća (Wu *et al.*, 1996). Takođe, kloniran je jedan gen koji kodira *GA3-ox* (Lee & Zeevaart, 2002) i tri gena koji kodiraju *GA2-ox* spanaća (Lee & Zeevaart, 2002; 2005).

Ekspresija gena koji kodiraju enzime iz metaboličkog puta GA je specifična za tip ćelije i najbolje je proučena u korenu *A. thaliana*. Ekspresija *AtGA20-ox1*, -2 i -3 je najveća u promeristenskoj zoni i tranzitnoj zoni, dok se *AtGA3-ox1* eksprimira samo iznad zone izduživanja. Suprotno tome, *AtGA3-ox2* se eksprimira u zoni izduživanja, meristemu i kolumeli glavnog i lateralnih korenova. *AtGA3-ox3* i *AtGA3-ox4* pokazuju jaku ekspresiju u svim delovima korena (Dugardeyn *et al.*, 2008). Od svih članova *AtGA2-ox* familije, *AtGA2-ox2*, -6 i -7 imaju najveću ekspresiju u glavnom korenu. Ekspresija *AtGA2-ox2* je najveća u meristenskoj zoni, *AtGA2-ox6* u zoni korenskih dlaka, dok je ekspresija *AtGA2-ox7* najveća u meristenskoj zoni i zoni izduživanja (Li *et al.*, 2019b). Za razliku od toga, svi članovi *AtGA2-ox* familije se ekspimiraju u lateralnim korenovima, ali se njihov obrazac ekspresije razlikuje tokom različitih faza razvića biljaka. Interesantno je napomenuti da se ekspresija *AtGA2-ox2*, -4, -6 i -8 naglo povećava u lateralnim korenovima kada su biljke izložene stresnim uslovima (Li *et al.*, 2019b).

1.2.2. Inhibitori biosinteze GA

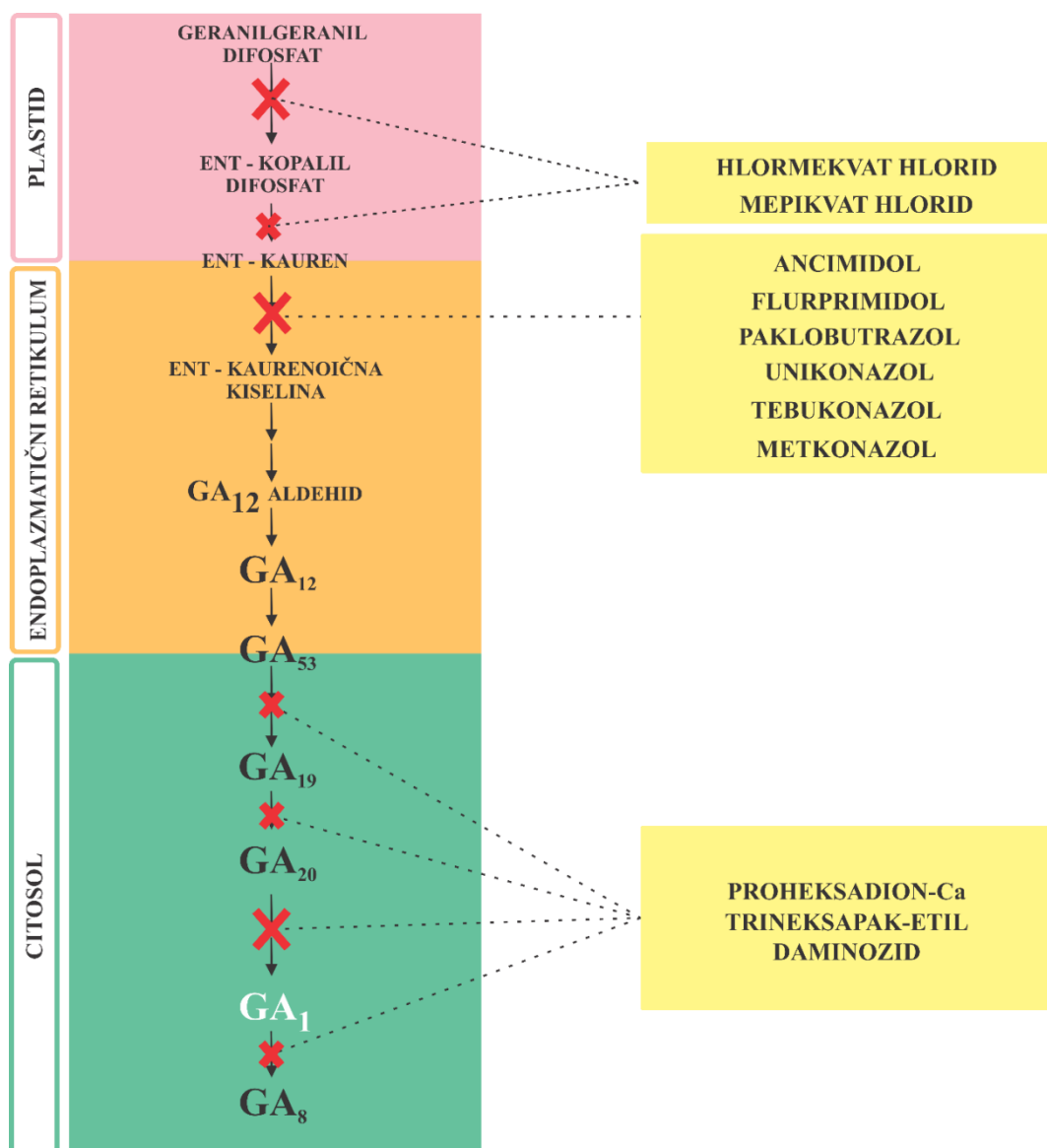
Retardanti rastenja su prirodne ili sintetičke supstance koje menjajući nivo endogenih hormona utiču na rastenje i razviće biljaka. Stoga, imaju ogroman značaj i primenu u poljoprivrednoj industriji, regulišući rastenje i razviće biljaka povećavaju prinos i kvalitet useva (Kumar *et al.*, 2000; Kumar, 2003; Yan *et al.*, 2011; Vineeth *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015). Mnogi od njih imaju osobine BRR, stoga imaju sposobnost da indukuju toleranciju biljaka na abiotički stres, povećavajući aktivnost antioksidativnog sistema u ćelijama. Pokazano je da njihova primena smanjuje osetljivost biljaka na brojne faktore abiotičkog stresa, kao što su suša, visoke i niske temperature, povišen nivo vode i povećan salinitet (Jaleel *et al.*, 2007a; Fahad *et al.*, 2015).

Inhibitori biosinteze GA predstavljaju grupu jedinjenja koja se dugi niz godina koriste u poljoprivredi kao retardanti rastenja i pružaju niz prednosti u proizvodnji useva (Hedden, 1999). Pokazano je da utiču na smanjenje broja deoba i elongaciju ćelija, čime se obustavlja ili usporava rastenje biljaka, što se često koristi radi sprečavanja suvišnog izduživanja stabla, koje vodi npr. poleganju žita (Rademacher, 2000, 2016; Kamran *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020b). Oni su takođe

značajna alternativa upotrebi mutanata prilikom proučavanja funkcije GA. S tim u vezi, njihov nedostatak je nespecifično delovanje u pojedinim slučajevima, ali imaju prednost u odnosu na mutante koja se ogleda u većoj kontroli vremena i mesta inhibicije GA u biljkama (Grossmann, 1990).

Inhibitori biosinteze GA se mogu podeliti u tri klase, a svaka specifična klasa blokira jednu od tri faze biosinteze GA (Sl. 2). U prvu klasu spadaju kvartenarna amonijumova jedinjenja (hlormekvat-hlorid, mepikvat-hlorid i AMO-1618) i fosfonijumova jedinjenja (hlorfenijum-hlorid) koja blokiraju sintezu *ent*-kaurena iz GGPP. Kako navedeni retardanti rasteža deluju kao opšti inhibitori terpenoidnih ciklaza, njihova specifičnost je mala (Douglas & Paleg, 1974; Hedden, 1999). Druga klasa se sastoji od heterocikličnih jedinjenja koja sadrže azot, kao što su ancimidol, tetciklaci i jedinjenja na bazi triazola (PAC, unikonazol). Ova jedinjenja inhibiraju oksidaciju *ent*-kaurena u *ent*-kaurenoičnu kiselinu, koju katalizuje P450 monooksigenaza tokom druge faze biosinteze GA. Smatra se da atomi azota inhibitora interaguju sa gvožđem u središtu hema citohroma P450, čime ova vrsta inhibitora pokazuje značajnu strukturnu i funkcionalnu specifičnost (Katagi *et al.*, 1987). Treća klasa uključuje acilcikloheksandione koji inhibiraju 2-oksoglutarat-zavisne dioksigenaze u trećoj fazi biosinteze GA. Acilcikloheksandioni, poput proheksadiona-Ca i trineksapak-etila, imaju slične strukture 2-oksoglutaratu i prema tome inhibiraju aktivnost dioksigenaza kompetirajući za supstrat (Srivastava, 2002).

PAC pripada grupi triazola koji poseduje osobine BRR. Od kada je prvi put otkriven od strane Lever *et al.* (1982) intenzivno se koristi u poljoprivrednoj industriji radi smanjenja vegetativnog rasta biljaka, povećanja debljine izdanaka, broja listova i poboljšanja razvića korena (Syahputra *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018b). Za ovu namenu, PAC je mnogo efikasniji od raznih drugih BRR i to u znatno nižim koncentracijama (Rady & Gaballah, 2012). PAC smanjuje rast biljaka inhibirajući biosintezu GA što za posledicu ima smanjeno izduživanje internodija usled smanjenja broja deoba i elongacije ćelija (Rahman *et al.*, 1989 a, b). Usled toga, biljke koje su tretirane PAC su nižeg rasta, razgranate su i proizvode više semena, što je potvrđeno kod repe (Zhou & Xi, 1993), kineskog krompira (Kishorekumar *et al.*, 2006), *Jatropha curcas* (Seesangboon *et al.*, 2018) i dr. biljnih vrsta. Nasuprt inhibitornom dejstvu PAC na izduživanje izdanaka, on stimuliše izduživanje korenova čime se povećava apsorpciona površina za usvajanje mineralnih materija. Pokazano je da povećava prečnik i dužinu korenova, kao i da stimuliše formiranje lateralnih korenova (Jaleel *et al.*, 2007a; Liu *et al.*, 2018b). Pored toga, PAC pozitivno utiče na izduživanje palisadnih ćelija listova kod uljane repe (Zhou & Xi, 1993) i pšenice (Sopher *et al.*, 1999). Primena PAC dovodi do povećanja asimilacije CO₂ u listovima i njihovog zadebljanja kod biljaka *Catharanthus roseus*, što poboljšava njihovo rasteženje u uslovima visokog saliniteta (Jaleel *et al.*, 2007b).



Slika 2. Enzimske reakcije na koje deluju inhibitori biosinteze GA. Modifikovano prema Rademacher (2016).

Navedene efekte na rastenje i razviće biljaka, PAC pre svega ostvaruje utičući na ravnotežu biljnih hormona (Jaleel *et al.*, 2008a,b; Wang *et al.*, 2020b). PAC inhibira aktivnost KO enzima blokirajući prelaz *ent*-kaurena u *ent*-kaurenoičnu kiselinu, čime utiče na izoprenoidni put, smanjujući nivo endogenih GA i etilena i povećavajući biosintezu citokinina i ABA (Kamountsis & Sereli, 1999; Upreti *et al.*, 2013). To se može objasniti činjenicom da kada je blokirana biosinteza GA dolazi do povećane akumulacije prekursora u terpenoidnom putu koji se onda koriste za povećanu sintezu citokinina i ABA (Rademacher, 1997). Pa tako, utičući na sintezu i katabolizam ABA, PAC povećava otpornost biljaka na sušu, smanjujući prekomeran gubitak vode. Povećanjem sinteze ABA, povećava se njena koncentracija u listovima, a glavna uloga ABA je da utiče na zatvaranje stoma sprečavajući na taj način gubitak vode transpiracijom. Pored toga, PAC smanjuje rastenje izdanaka, dovodi do anatomskih promena na listovima koje sprečavaju gubitak vode i stimuliše izduživanje korenova čime se povećava površina za usvajanje vode. Kod mnogih biljnih vrsta, kao što su jagoda (Parvin *et al.*,

2015), krastavac (Baninasab & Ghobadi, 2011) i soja (Asare-Boamah *et al.*, 1986), tretman PAC doveo je do smanjenja nivoa transpiracije, povećanja sadržaja vode u biljkama, usled čega je bio povećan prinos navedenih useva u uslovima suše. PAC povećava otpornost biljaka na abiotički stres i preko drugih mehanizama koji ne podrazumevaju samo povećanje biosinteze ABA. U uslovima suše dolazi da značajnog oštećenja strukture hloroplasta, smanjenja sinteze fotosintetičkih pigmenta, što za posledicu ima smanjen nivo fotosinteze i moguću pojavu prerane senescencije listova (Kolodziejek *et al.*, 2003). PAC stimuliše biosintezu fotosintetičkih pigmenta (Kumar *et al.*, 2012), jer biljke tretirane PAC sintetišu više citokinina (Upreti *et al.*, 2013; Seesangboon *et al.*, 2018), koji zatim stimulišu diferencijaciju hloroplasta i biosintezu fotosintetičkih pigmenta, sprečavaju razgradnju hloroplasta i odlažu senescenciju listova (Fletcher & McCullag, 1971; Fletcher *et al.*, 2000; Nivedithadevi *et al.*, 2015; Cortleven & Schmölling, 2015; Cortleven *et al.*, 2016). Pretpostavlja se da je smanjenje razgradnje hloroplasta kod biljaka tretiranih PAC posledica smanjenja oštećenja prouzrokovanih delovanjem ROS (Kumar *et al.*, 2012). PAC izaziva povećanje aktivnosti antioksidativnog sistema, kako povećanjem enzimske komponente, SOD, peroksidaza itd. (Gopi *et al.*, 2007; Sankar *et al.*, 2007; Mohamed *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2013; Abbasi *et al.*, 2015; Jungklang *et al.*, 2017), tako i neenzimske komponente, karotenoida, askorbata, tokoferola, redukovano glutaciona itd. (Sankar *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2012; Jungklang *et al.*, 2017). Na ovaj način dolazi do smanjenja peroksidacije lipida i oštećenja ćelijske membrane, što doprinosi povećanju otpornosti biljaka prema abiotičkom stresu, kao što su povećan salinitet i niske temperature (Jungklang & Saengnil, 2012; Pan *et al.*, 2013; Jungklang *et al.*, 2017).

1.2.3. Molekularni mehanizmi delovanja inhibitora biosinteze GA

Kao što je već rečeno, inhibitori biosinteze GA utičući na promene u metabolizmu, signalnim putevima i interakcijama hormona, utiču na promenu koncentracije hormona u biljnom tkivu, a zatim i na niz fizioloških procesa (Wang *et al.*, 2014, 2020b; Zhang *et al.*, 2015; Seesangboon *et al.*, 2018). Posle aplikacije PAC, u klasju biljaka *Agapanthus praecox* došlo je do promene nivoa ekspresije čak 2838 gena, od toga 75 transkripcionih faktora, od kojih je većina imala smanjenu ekspresiju (Zhang *et al.*, 2015), dok je u cvetnim pupoljcima *Jatropha curcas* detektovana promena ekspresije 96 gena koji učestvuju u biosintezi i signalnom putu biljnih hormona (Seesangboon *et al.*, 2018).

Inhibitori biosinteze GA su izazvali smanjenje ekspresije gena koji kodiraju enzime za biosintezu i signalni put auksina, brasinosteroida, jasmonata i etilena, dok je ekspresiju gena čiji proizvodi učestvuju u metabolizmu i signalnom putu citokinina i ABA bila povećana (Zhang *et al.*, 2015; Seesangboon *et al.*, 2018; Gazara *et al.*, 2019; Qiu *et al.*, 2019; Duan *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020b). U skladu sa očekivanjima, inhibitori biosinteze GA su izazivali smanjenje bioaktivnih GA u biljnom tkivu, ali različitim mehanizmima kod različitih biljnih vrsta. PAC nije uticao na smanjenje ekspresije gena uključenih u biosintezu GA kod *A. praecox* i *J. curcas*, već gena uključenih u transdukciju GA signala (Zhang *et al.*, 2015; Seesangboon *et al.*, 2018). Kao i PAC, mepikvat-hlorid je u biljkama pamuka inhibirao ekspresiju gena koji kodiraju anaboličke enzime CPS, KS, GA20-ox i GA3-ox, katabolički enzim GA2-ox i proteine koji učestvuju u transdukciji signala (Wang *et al.*, 2014, 2020b).

PAC, unikonazol i mepikvat-hlorid su uticali na povećanje koncentracije citokinina (Seesangboon *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2015; Gazara *et al.*, 2019; Qiu *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020b). PAC je kod *J. curcas* izazvao inicijalno povećanje ekspresije gena koji kodira izopentenil transferazu (IPT), smanjenje ekspresije negativnih regulatora *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR* (ARR) i gena koji kodiraju katabolički enzim citokinin oksidazu/dehidrogenazu (CKX, Seesangboon *et al.*, 2018), dok je kod soje takođe uticao na smanjenje ekspresije negativnih ARR tipa A regulatora, ali nije

imao efekta na gene uključene u metabolizam citokinina (Gazara *et al.*, 2019). Unikonazol je uticao na smanjene ekspresije *CKX* gena, povećanje ekspresije citokininskih receptora, a preko ARR tipa B je uticao na ekspresiju *STAY-GREEN2* (*SGR2*) gena (Liu *et al.*, 2015). *SGR* geni kodiraju magnezijum-dehelatazu, koja uklanja Mg iz hlorofila, čime počinje degradacija hlorofila (Shimoda *et al.*, 2016). Inhibicijom ekspresije *SGR* gena se sprečava degradacija hloroplasta i senescencija listova.

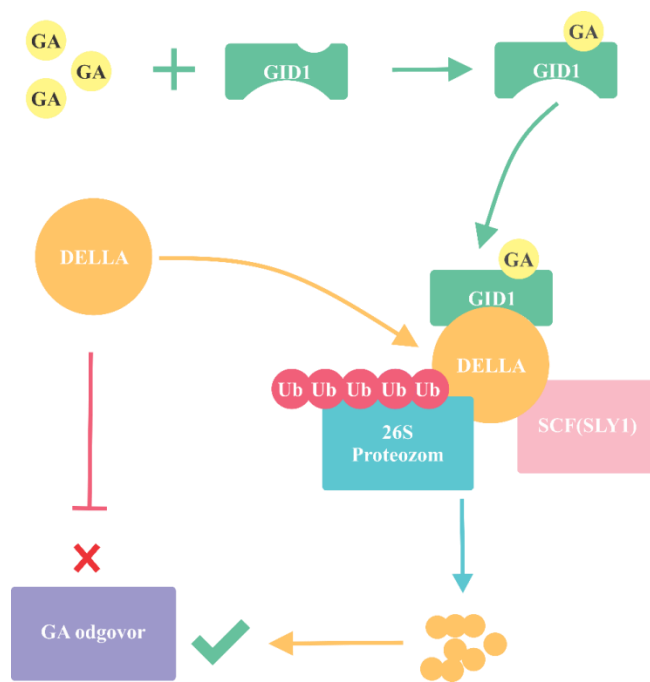
PAC i unikonazol su izazvali povećanje koncentracije ABA u ćelijama usled povećane ekspresije ABA receptora i smanjene ekspresije negativnih regulatora signalnog puta ABA (Liu *et al.*, 2015; Gazara *et al.*, 2019; Duan *et al.*, 2019). Smanjenja koncentracije IAA nakon primene PAC i mepikvat-hlorida je došlo usled smanjene ekspresije gena koji kodiraju enzime koji katalizuju biosintezu (YUCCA) i polarni transport auksina (PIN), kao i ekspresija gena uključenih u signalni put auksina - auksinskog receptora, ARF i AUX/IAA represora transkripcije (Gazara *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020b).

U većini studija nije utvrđeno da li inhibitori biosinteze GA deluju direktno na signalne puteve biljnih hormona, dok je kod pamuka uticaj mepikvat-hlorida bio indirektan, preko inhibicije biosinteze GA, s obzirom da je njegov uticaj bio poništen egzogenim GA₃ (Wang *et al.*, 2020b).

Snižena koncentracija bioaktivnih GA usled primene PAC ili mepikvat-hlorida je negativno uticala na procese ćelijske deobe, ćelijski ciklus i sintezu ćelijskog zida (Zhang *et al.*, 2015; Gazara *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2014, 2020b). PAC je uticao na smanjenje ekspresije 30 gena koji su uključeni u sintezu ćelijskog zida u embrionalnom tkivu soje tokom klijanja semena (Gazara *et al.*, 2019). Pokazano je da je smanjenje broja ćelija i izduživanje ćelija internodusa klijanaca pamuka posledica izmenjene ekspresije gena uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa, pre svega zbog smanjene ekspresije kinaza zavisnih od ciklina (*cyclin-dependent kinase* - CDK) i ciklina specifičnih za G2 fazu mitoze i kontrolnih proteina koji inaktiviraju regulatore ćelijskog ciklusa proteolitičkom degradacijom, kao i povećane ekspresije inhibitora ćelijskog ciklusa (Wang *et al.*, 2020b).

1.2.4. Signalni put GA

Otkriće GA receptora kod *gid1* mutanta pirinča koji su neosetljivi prema GA, dovelo je do velikog pomaka u razumevanju signalnog puta GA (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). Mehanizam percepcije GA signala je konzervisan kod biljaka, što je pokazano kod *A. thaliana* i pirinča kod kojih je signalni put detaljno proučen. Pirinač poseduje samo jedan *GID1* gen, dok su kod *A. thaliana* prisutna tri funkcionalna homologa ovog gena (*GID1a,b,c*), a gubitak funkcije sva tri gena kod *A. thaliana* je potreban da bi izostao GA odgovor (Griffiths *et al.*, 2006; Willige *et al.*, 2007). *GID1* se uglavnom nalazi u jedru, mada je njegovo prisustvo detektovano i u citoplazmi. Pokazano je da *GID1* poseduje veći afinitet za vezivanje biološki aktivnih GA (GA₁, GA₃ i GA₄) za razliku od neaktivnih oblika GA. Međutim, afinitet vezivanja GA₄ za *GID1* je 20 puta veći od GA₃, iako GA₄ poseduje manju fiziološku aktivnost od GA₃. Navedeno neslaganje između afiniteta za vezivanje *GID1* i fiziološke aktivnosti GA₃ i GA₄ se ogleda u njihovoj različitoj stabilnosti u biljkama. GA₄ čak i u nižim koncentracijama podleže bržoj degradaciju u poređenju sa GA₃ (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2007).



Slika 3. Model signalnog puta giberelina (GA) koji je posredovan DELLA proteinima. Modifikovano prema Salazar-Cerezo *et al.* (2018).

Signalni put GA otpočinje vezivanjem biološki aktivnih GA za GID1 receptor koji onda intereaguje sa DELLA proteinima, koji predstavljaju glavne represore signalnog puta GA. DELLA proteini su konzervativni kod različitih biljnih vrsta, uključujući *A. thaliana*, pšenicu, kukuruz i pirinač (Peng *et al.*, 1997, 1999; Ikeda *et al.*, 2001; Chandler *et al.*, 2002). *A. thaliana* poseduje 5 gena koji kodiraju DELLA proteine: *REPRESSOR OF GA1-3 (RGA1)*, *GA INSENSITIVE (GAI)*, i *RGA-LIKE 1 (RGL1)*, *RGL2* i *RGL3*, koji imaju različite funkcije, ali u odsustvu GA svi deluju kao represori rastjenja (Peng *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 2001; Silverstone *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002). DELLA proteini pripadaju visoko konzervativnoj GRAS familiji regulatornih proteina koji poseduju C-terminalni GRAS domen koji je uključen u "F box" proteinsko vezivanje (Ogawa *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2001; Chandler *et al.*, 2002). Za razliku od ostalih proteina u okviru GRAS familije, DELLA proteini poseduju N terminalni domen koji se sastoji iz dva visoko konzervativna domena: DELLA domen i VHYNP domena. U prisustvu GA, ova dva domena DELLA proteina omogućavaju njegovo vezivanje za GID1 receptor, nakon čega se ceo kompleks (GA-GID1-DELLA) vezuje za F-box protein "SLEEPY1" (SLY1) (Lechner *et al.*, 2006). Nakon toga, započinje ubikvitinizacija DELLA proteina preko SCF^{SLY1}Ube3 ligaze, čime se oni označavaju za degradaciju u 26S proteozomima, usled čega se geni čiju ekspresiju indukuju GA oslobađaju represije (Sl. 3) (Dill *et al.*, 2004; Fleet & Sun, 2005; Harberd *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2011; Wallner *et al.*, 2016; Salazar-Cerezo *et al.*, 2018). U slučaju odsustva GA, sprečena je degradacija DELLA proteina, a samim tim i odgovor na GA. To se dešava pod uticajem specifičnog inhibitora 26S proteozoma (npr. MG123), koji inhibira degradaciju DELLA, kao i inhibira biosinteze GA, npr. PAC (Dill *et al.*, 2004). Interesatno je pomenuti da je degradacija DELLA proteina u prisustvu GA specifična za određeni tip ćelije, uspostavljajući na taj način normalno rastenje ćelija unutar tkiva. Na primer, u korenu *A.thaliana* je pokazano da su ćelije endodermisa primarno mesto za degradaciju DELLA proteina posredstvom GA (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

1.2.5. Povratna sprege kao kontrola dinamike sinteze giberelina

Budući da GA imaju važne uloge u rastanju i razviću biljaka, neophodno je postojanje mehanizama kojim će se regulisati nivo GA koji je potreban za odvijanje fizioloških procesa. Jedan od tih mehanizama se zasniva na sposobnosti biološki aktivnih GA da kontrolišu sopstveni nivo kroz regulaciju biosinteze mehanizmom povratne sprege. Ovaj efekat je prvi put primećen kod mutanata koji su neosetljivi prema GA (Hedden & Croker, 1992). Ovi mutanti pšenice (*rht3*) i kukuruza (*d8*), poseduju veći nivo bioaktivnog GA₁, dok je nivo GA₁₉ niži u poređenju sa divljim tipom (Appleford & Lenton, 1991).

Slično je i kod mutanta kukuruza (*d1*) i graška (*le*) kod kojih je prisutna mutacija u 3-β-hidroksilaciji i koji sadrže visok nivo GA₂₀, ali smanjen nivo GA₅₃ i GA₁₉ u poređenju sa divljim tipom. Egzogeno primena GA, *d1* i *le* mutantima omogućava da nivo GA bude približan nivou divljeg tipa, što ukazuje da je GA_{20-ox} pod snažnom kontrolom negativne povratne sprege (Hedden & Croker, 1992). Suprotno tome, mutanti graška (*lacrys*) koji su osetljivi prema GA, sadrže smanjen nivo iRNK za GA_{20-ox} u odnosu na divlji tip. Egzogeno primena GA na biljke divljeg tipa, dovela je do smanjenja količine transkripta za GA_{20-ox} i nivoa GA₁, slično *lacrys* mutantima (Martin *et al.*, 1996). Takođe, biljake tretirane inhibitorima biosinteze GA su sadržale veći nivo transkripta za GA_{20-ox} i GA_{3-ox} i snižen nivo transkripta za GA_{2-ox} kao odgovor na smanjenu količinu bioaktivnih GA (Chiang *et al.*, 1995; Phillips *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1999). Za razliku od toga, kod biljaka tretiranih egzogenim GA uočena je smanjena transkripcija gena koji kodiraju enzime uključene u biosintezu GA (Phillips *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1999).

Održavanje homeostaze GA mehanizmom povratne sprege se može pratiti kod transgenih biljaka kod kojih je prisutna prekomerna ekspresija gena za metabolizam GA, što omogućava da se identifikuju stupnjevi koji ograničavaju sintezu bioaktivnih GA (Hedden & Phillips, 2000). Pa tako, prekomerna ekspresija gena koji su uključeni u ranim fazama biosinteze GA kod *A. thaliana* (*AtCPS* i *AtKS*) je dovela do akumulacije *ent*-kaurena i *ent*-kaurenoične kiseline, kao i GA₁₂ i GA₂₄ (Sl. 1), ali ne i do promene količine bioaktivnih GA niti morfologije biljke (Radi *et al.*, 2006; Fleet *et al.*, 2003). Ovo ukazuje da rani enzimi u biosintetskom putu GA nisu regulisani povratnom spregom. Međutim, utišavanje ekspresije gena za KS kod biljaka *A. thaliana* metodom interference RNK (RNKi) izaziva pojavu patuljastog rasta (Papareli *et al.*, 2013). Ova pojava ukazuje da nedovoljna količina prekursora onemogućava održanje homeostaze GA. Sa druge strane kod mnogih biljnih vrsta, uključujući i *A. thaliana*, prekomerna ekspresija *GA20-ox* dovodi do pojave izduženog fenotipa biljaka, što je posledica povećanog nivoa bioaktivnih GA (Huang *et al.*, 1998; Coles *et al.*, 1999; Carrera *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2003; Radi *et al.*, 2006; Bhattacharya *et al.*, 2012; Fukazawa *et al.*, 2017). Navedene činjenice ukazuju da je GA_{20-ox} pod snažnom kontrolom negativne povratne sprege i da aktivnost ovog enzima predstavlja ograničavajući faktor u produkciji bioaktivnih GA (Hedden, 2016). U slučaju prekomene ekspresije *GA3-ox* postoje kontradiktorni rezultati kod različitih biljnih vrsta. Kod transgenih linija hibridne topole *Populus tremula*, prekomerna ekspresija *GA20-ox* je dovela do povećane sinteze bioaktivnih GA, dok je kod transgenih biljaka sa prekomernom ekspresijom *GA3-ox* dolazilo do povećane 3-β-hidroksilacije, ali nije bilo prisutno povećanje nivoa bioaktivnih GA, niti je dolazilo do promena u rastanju i morfologiji biljaka (Israelsson *et al.*, 2004), što dovodi do zaključka da je GA_{20-ox} pod snažnijom kontrolom negativne povratne sprege u odnosu na GA_{3-ox}. Slično tome, prekomerna ekspresija *PsGA3-ox* graška u biljkama duvana, dovela je samo do neznatnih promena u morfologiji biljaka i količini bioaktivnih GA (Gallego-Giraldo *et al.*, 2008). Međutim, biljke *A. thaliana* koje su transformisane genom *GA3-ox1* pokazivale su izduženi fenotip i ubrzano razviće (Radi *et al.*, 2006). Pokazano je da prekomerna ekspresija *GA3-ox1* izaziva povećanje nivoa aktivnog GA₄ i njegovog kataboličkog produkta GA₃₄ dok na ostale GA ne utiče (Radi *et al.*, 2006), što ukazuje

da u slučaju *A. thaliana* GA3-ox predstavlja ograničavajući faktor u produkciji bioaktivnih GA. Pored toga, pokazano je da je *GA3-ox1* pod dejstvom negativne povratne sprege, ali ne i *GA3-ox2*, za koga se smatra da izaziva povećavanje količine aktivnih GA do granice koja je potrebna da bi se pokrenuo neki fiziološki odgovor, a da kasnije ta količina GA indukuje negativnu povratnu spregu (Yamaguchi *et al.*, 2001). Za razliku od biosintetičkih enzima koji su regulisani negativnom povratnom spregom, povećan nivo bioaktivnih GA pozitivno utiče na akumulaciju kataboličkih enzima. Pokazana je povećana ekspresija gena za katabolizam GA kod *A. thaliana* (*AtGA2-ox1* i *AtGA2-ox2*) i pirinča (*OsGA2-ox1* i *OsGA2-ox3*) nakon egzogene primene GA₃ (Sasaki *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2006; Denis *et al.*, 2017).

Molekularni mehanizmi pomoću kojih biološki aktivni GA regulišu sopstveni nivo mehanizmom povratne sprege, nisu još uvek u potpunosti poznati. Smatra se da glavne komponente signalnog puta, kao što su GID1 receptor, DELLA proteini, F-box protein *SLEEPY1*, mogu biti deo molekularnih mehanizama koji su odgovorni za održavanje homeostaze GA (Dill & Sun, 2001; Sasaki *et al.*, 2003; Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2007; Zentella *et al.*, 2007; Fukazawa *et al.*, 2014; Boccaccini *et al.*, 2014). Pokazano je da DELLA proteini utiču na homeostazu GA delujući negativnom povratnom spregom na ekspresiju gena *GA20-ox* i *GA3-ox* (Zentella *et al.*, 2007). Kod dvostrukog mutanta DELLA proteina, *gai-16 rga28*, pokazana je smanjena ekspresija *AtGA3-ox1* (Oh *et al.*, 2007), dok je kod mutanta pirinča, *gid1* i *gid2*, prisutno značajno povećanje ekspresije *OsGA20-ox2* (Sasaki *et al.*, 2003; Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). Identifikacija pojedinih transkripcionih faktora je omogućila dobijanje dodatnih informacija o molekularnim mehanizmima koji leže u osnovi odražavanja homeostaze GA. Pokazano je da transkripcioni faktor *REPRESSION OF SHOOT GROWTH* (RSG) kod duvana, čiju ekspresiju negativno regulišu bioaktivni GA, može da utiče na ekspresiju *GA20-ox* putem negativne povratne sprege. Izgleda da je moguća uloga RSG u održavanju homeostaze GA ograničena samo na *GA20-ox*, jer je pokazano da ne utiče na promenu ekspresije *GA3-ox* (Ishida *et al.*, 2004). Sa druge strane, pokazano je da transkripcioni faktor YABBY ima sposobnost da se veže za promotore gena *OsGA3-ox2* (Dai *et al.*, 2007) i *OsGA20-ox2* (Yang *et al.*, 2016), vršeći na taj način represiju ovih gena. Takođe, transkripcioni faktor kod *A. thaliana* *AT hook* protein (AGF1) u prisustvu GA do sada nepoznatim mehanizmom smanjuje ekspresiju *AtGA3-ox1* (Matsushita *et al.*, 2007). Navedene činjenice ukazuju da se regulacija ekspresije gena *GA20-ox* i *GA3-ox* putem negativne povratne sprege zasniva na različitim mehanizmima. Moguće je i da postoji nekoliko mehanizama za regulisanje negativne povratne sprege pojedinačnih gena, kako bi se omogućila interakcija različitih nivoa regulacije. Na primer, za AGF1 je pokazano da je neophodan, ali i nedovoljan za regulaciju mehanizma povratne sprege *GA3-ox*, što ide u prilog činjenici da je za ovakvu regulaciju neophodno više faktora (Matsushita *et al.*, 2007).

1.2.6. Percepcija svetlosti

Sposobnost biljaka da na pravilan način odgovore na različite uslove spoljašnje sredine je veoma važna za njihovo preživljavanje i reprodukciju. Intenzitet, kvalitet i dužina trajanja (fotoperiod) svetlosti svakako predstavljaju jedne od važnih faktora spoljašnje sredine koji utiču na rastenje i razviće biljaka. Kako bi mogle da usklade svoje rastenje i razviće sa promenljivim svetlosnim uslovima, biljke su kao sesilni organizmi morale da razviju niz različitih tipova fotoreceptora koji vrše percepciju svetlosti različitih talasnih dužina (Possart *et al.*, 2014; Ballaré & Pierik, 2017; Mawphlang & Kharshiing, 2017). Najvažniji fotoreceptori biljaka su fitohromi i kriptohomi. Ovi receptori poseduju hromoforu koja apsorbuje svetlost i pretvara je u biohemijske signale koji dovode do aktivacije mnogih enzima, uspostavljajući specifične protein-protein interakcije (Kong & Okajima, 2016). Kriptohrom je receptor koji apsorbuje plavu svetlost (B). Kod većine biljnih vrsta kriptohrom

kodira familija gena. Najmanje dva gena, CRY1 i CRY2, kodiraju za kriptohrom kod *A. thaliana*, koji imaju različite funkcije (Cashmore *et al.*, 1999). Kriptohrom CRY1 je fotostabilan i glavni je receptor B svetlosti, dok je CRY2 fotolabilan i ima sposobnost da apsorbuje samo B svetlost niskog intenziteta (Lin *et al.*, 1998). Sa druge strane, fitohromi su receptori koji apsorbuju crvenu (R) i tamnocrvenu (FR) svetlost. Odnos R:FR biljci omogućava da proceni opseg aktivne svetlosti i da u vezi sa tim uskladi svoje rasteње i razviće (Rockwell *et al.*, 2006). Fitohrom se u biljkama može naći u dve spektralno različite fotointerkonvertibilne forme: Pr (apsorbujuća forma crvene-R svetlosti) i Pfr (apsorbujuća forma tamnocrvene-FR svetlosti). Pr je neaktivna forma fitohroma koja nakon apsorpcije R svetlosti prelazi u aktivnu Pfr formu. Pod uticajem FR svetlosti Pfr forma reverzibilno prelazi u Pr formu. Maksimalna apsorpcija Pr je 660 nm, a Pfr 730 nm (Chory *et al.*, 1996; Rockwell *et al.*, 2006). Nakon konformacione promene pod uticajem R svetlosti, Pfr forma prelazi iz citoplazme u jedro gde dovodi do aktivacije niza transkripcionih faktora, koji onda menjaju ekspresiju gena na koje utiče svetlost. Na taj način, fitohromi prevode informacije o svetlosnim uslovima u signale koji kontrolišu gotovo sve faze tokom rasteња i razvića biljaka, od klijanja semena do cvetanja.

1.2.7. Uticaj svetlosti na biosintezu giberelina

Mnoga istraživanja su pokazala da svetlost koju apsorbuju fitohromi dovodi do promene koncentracije GA i/ili menja osetljivost tkiva prema GA tokom klijanja semena i procesa de-etiolacije biljaka (Kamiya & Garcia-Martinez, 1999; Yamaguchi & Kamiya, 2000; Olszewski *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2018b).

Pre više od pola veka je otkrivena uloga fitohroma u kljijanju semena kod zelene salate (Borthwick *et al.*, 1952). Pokazano je da R svetlost stimuliše, dok FR svetlost inhibira ovaj proces (Borthwick *et al.*, 1952). Zbog toga što egzogeno dodati GA stimulišu kljijanje semena u mraku, imitirajući na taj način efekat R svetlosti, pretpostavilo se da R svetlost stimuliše kljijanje semena povećavajući ekspresiju gena uključenih u biosintezu GA. Ova pretpostavka je potvrđena u kasnijim istraživanjima u kojima je pokazano da fitohrom reguliše biosintezu GA tako što promoviše 3-β-hidroksilaciju (Toyomasu *et al.*, 1998; Sawada *et al.*, 2008, Nakaminami *et al.*, 2003). Povećanje nivoa GA₁ u tretmanu FR+R osvetljavanjem imbibovanih semena zelene salate (Sawada *et al.*, 2008) i *A. thaliana* (Shinomura *et al.*, 1996) je posledica stimulacije ekspresije *GA3-ox1* i *GA3-ox2* i inhibicije ekspresije *GA2-ox2* R svetlošću. Kod *A. thaliana* fitohrom kodira familija kuju čini 5 gena (PHYA-E). Poznato je da PHYB apsorbuje R svetlost stimulišući kljijanje semena tokom početnih faza imbibicije (do nekoliko sati), dok PHYA apsorbuje FR svetlost i stimuliše kljijanje semena tokom kasnijih faza imbibicije i u odsustvu aktivne forme PHYB (Shinomura *et al.*, 1994; Rausenberger *et al.*, 2011). Kod *phyB* mutanta je pokazano da dolazi do povećane ekspresije *AtGA3-ox2* pod uticajem R svetlosti, što ukazuje da je ovaj tip fitohroma odgovoran za indukciju kljijanja semena kod *A. thaliana* (Yamaguchi *et al.*, 1998).

Kao što je već pomenuto, nakon apsorpcije R svetlosti, Pfr forma fitohroma prelazi u jedro gde interaguje sa transkripcionim faktorima, menjajući na taj način ekspresiju gena uključenih u metabolizam GA. Jedan od najznačajnijih transkripcionih faktora koji posreduje u interakciji GA i svetlosti je *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR1* (PIF1) (Park *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019a). U uslovima mraka, kada je PHYB prisutan u neaktivnom obliku, PIF1 inhibira kljijanje semena tako što povećava ekspresiju *GA2-ox2*, a smanjuje ekspresiju *GA3-ox1* i *GA3-ox2* (Oh *et al.*, 2004, 2007). U uslovima R svetlosti Pfr aktivna forma PHYB se transportuje u jedro i fosforiliše PIF1, usled čega dolazi do njegove ubikvitinizacije i degradacije u 26S proteozomima (Zhao *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2016). Na ovaj način se *GA3-ox1* i *GA3-ox2* oslobađaju represije, što dovodi do povećane biosinteze endogenih GA, koji onda indukuju kljijanje semena. PIF1 nema

sposobnost da se direktno veže za promotore gena uključenih u metabolizam GA, što ukazuje da postoje dodatne komponente sa kojima interaguje da bi izvršio regulaciju ekspresije ovih gena. Međutim, PIF1 direktno može da se veže za promotore *GAI* i *RGA* koji kodiraju za DELLA proteine, koji onda direktno vrše represiju gena uključenih u biosintezu GA (Oh *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2016). Pored toga, PIF1 može da utiče na ekspresiju gena uključenih u metabolizam GA i preko drugih mehanizama koji ne podrazumevaju prisustvo DELLA proteina. Pa tako je pokazano da PIF1 utiče na nivo GA kroz aktivaciju *DOF AFFECTING GERMINATION 1* (*DAG1*) transkripcionog faktora koji se vezuje za promotor *GA3-ox1* gena, vršeći njegovu represiju (Gabriele *et al.*, 2010). Slično tome, PIF1 interaguje sa *SOMUNUS* (*SOM*) transkripcionim faktorom koji onda vrši represiju *GA3-ox1* i *GA3-ox2* gena i stimuliše ekspresiju *GA2-ox2* gena (Kim *et al.*, 2008). U uslovima mraka *SOM* nakon aktivacije od strane PIF1 inhibira aktivnost histon arginin demetilaza, koje kodiraju geni *JUMONJI 20* (*JMJ20*) i *JMJ22*. Smanjen nivo ekspresije *JMJ20* i *JMJ22*, dovodi do visokog stepena metilacije hromatina na *GA3-ox1* i *GA3-ox2* lokusu, inhibirajući transkripciju ovih gena. Međutim, u uslovima R svetlosti izostaje aktivacija *SOM* od strane PIF1 koji je degradovan, čime se povećava ekspresija *JMJ20* i *JMJ22* gena, dovodeći do demetilacije hromatina i povećane transkripcije *GA3-ox1* i *GA3-ox2* gena (Cho *et al.*, 2012).

Fitohromi u interakciji sa PIF transkripcionim faktorima (PIF3 i PIF4) učestvuju u procesu de-etiolacije biljaka, ali je njihov efekat u ovom procesu inhibitoran (De Lucas *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008). Tokom procesa de-etiolacije dolazi do smanjenja količine bioaktivnih GA, a time i redukcije izduživanja stabiljke (Ait-Ali *et al.*, 1999; O'Neill *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2002). Do smanjenja nivoa GA₁ dolazi nakon 4h izlaganja klijanaca graška R ili B svetlosti (Foo *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2002). Smanjen nivo bioaktivnih GA u procesu de-etiolacije biljaka je posledica smanjenja ekspresije *GA3-ox1* i povećanja ekspresije *GA2-ox1* (Reid *et al.*, 2002). Smatra se da glavnu ulogu u percepciji svetlosti u ovom procesu imaju *PHYA* i *CRY1*, ali ne i *PHYB* (Xu *et al.*, 2016). U slučaju *A. thaliana* redukcija izduživanja hipokotila je posredovana *CRY1* i *CRY2*, usled čega dolazi do smanjenja ekspresije *AtGA20-ox1* i *AtGA3-ox1* u uslovima B svetlosti (Zhao *et al.*, 2007). Slično tome, B svetlost je inhibirala izduživanje hipokotila klijanaca paradajza povećavajući ekspresiju *GA2-ox7* gena (Matsuo *et al.*, 2018).

Molekularni mehanizmi koji leže u osnovi efekta plave svetlosti ukazuju da *CRY* imaju ulogu u inaktivaciji *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1* (*COPI*) koji kodira za ubikvitinsku ligazu promovišući degradaciju transkripcionog faktora *ELONGATED HYPOCOTYL 5* (*HY5*) koji stimuliše ekspresiju gena u prisustvu svetlosti (Duek *et al.*, 2004; Lau & Deng, 2012; Podolec & Ulm, 2018). U uslovima mraka, smanjen nivo GA indukuje proces de-etiolacije biljaka, međutim ovaj efekat GA izostaje kod *hy5* mutanta, što ukazuje na važnu ulogu *HY5* u kontroli ovog procesa posredstvom GA (Alabadí *et al.*, 2008). Takođe, mutacija *LONG1* gena, homolognog genu *HY5* kod graška, u uslovima svetlosti dovodi do drastičnih promena u ekspresiji gena uključenih u biosintezu GA, ali ne utiče na signalni put GA (Alabadí *et al.*, 2008; Weller *et al.*, 2009). Smatra se da pod uticajem svetlosti *HY5* smanjuje nivo bioaktivnih GA, mada molekularni mehanizam kojim se to dešava još uvek nije poznat (Wang *et al.*, 2019a).

Pored različitih talasnih dužina svetlosti, pokazano je da dužina trajanja svetljenja (fotoperiod) ima ogroman uticaj na biosintezu GA. Rozetaste biljke dugog dana kao što su *A. thaliana*, *Lolium temulentum* i spanać, rastu vegetativno i ne izdužuju ćelije stabla u uslovima kratkog dana (KD, 8h svetlosti). Po izlaganju uslovima dugog dana (DD, 12h svetlosti ili duže, Ćulafić & Nešković, 1973), ćelije stabla se izdužuju i biljke cvetaju. U fotoperiodskoj reakciji posreduje GA, jer jedino aplikacija GA može povratiti normalan fenotip kod biljaka sa patuljastim rastom (Phinney, 1984). Egzogeni GA₃ indukuje cvetanje kod spanaća u uslovima KD (Ćulafić & Nešković, 1980; Zeevaart *et al.*, 1993), dok

primena inhibitora biosinteze GA inhibira izduživanje ćelija stabla u uslovima DD (Ćulafić & Nešković, 1980; Talon & Zeevaart, 1990). Prebacivanje biljaka spanaća sa uslova KD u uslove DD dovelo je do povećanja nivoa GA₁₉, što se prvenstveno može pripisati regulisanju transkripta za *SoGA20-ox1*, što ukazuje da je ekspresija ovog gena pod kontrolom fotoperioda (Wu *et al.*, 1996; Lee & Zeevaart, 2002, 2005). Takođe, kod spanaća je detektovana veća količina informacione RNK (iRNK) za *GA20-ox* u uslovima DD nego u uslovima KD ili u mraku (Wu *et al.*, 1996). Za razliku od toga, nisu detektovane značajne promene u ekspresiji *GA3-ox* gena u uslovima DD, što ukazuje da ekspresija ovog gena nije pod kontrolom fotoperioda (Lee & Zeevaart, 2005).

1.2.8. Uticaj svetlosti na biosintezu, signalni put i transport auksina

Svetlost utiče na nivo i distribuciju auksina u biljnom organizmu, regulišući na taj način mnoge aspekte životnog ciklusa biljaka. Svetlost stimuliše biosintezu auksina u listovima i utiče na njegovu distribuciju duž celog klijanca, menjajući osetljivost individualnih ćelija prema auksinu (Salisbury *et al.*, 2007).

Uticaj svetlosti na biosintezu auksina može biti stimulativan ili inhibitoran u zavisnosti od faze životnog ciklusa biljaka. Svetlost inhibira biosintezu auksina u momentu de-etiolacije biljaka. Tokom de-etiolacije dolazi do inhibiranja izduživanja hipokotila etioliranih biljaka, dok se stimuliše razvijanje apikalnog meristema i listova. Kod deetiroliranih biljaka aktivna forma fitohroma stimuliše ekspresiju *SUPERROOT 2 (SUR2)* i inhibira ekspresiju *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE (TAA1)* gena. SUR2 je citohrom P450 monooksigenaza koja reguliše ravnotežu između IAA i indol glukozinolata i smanjuje koncentraciju slobodne IAA, a TAA1 je triptofan aminotransferaza, koja katalizuje konverziju triptofana u IAA (Hoecker *et al.*, 2004; Grubb & Abel, 2006). Pored toga, PHYA i PHYB regulišu transkripciju *GRETCHEN HAGEN 3 (GH3)* gena (Tanaka *et al.*, 2002), koji kodiraju konjugaciju IAA i amino kiselina, pri čemu dolazi do skladištenja ili degradiranja IAA (Staswick *et al.*, 2005). Nasuprot tome, svetlost stimuliše biosintezu auksina tokom sindroma izbegavanja senke kod biljaka. Kada pređu na fotoautotrofan način života, mlade biljke se nalaze u kompeticiji za svetlošću sa ostalom vegetacijom. Kako bi mogle da apsorbuju dovoljnu količinu svetlosti za odvijanje fotosinteze, biljke uz pomoć fitohroma mogu da detektuju nizak odnos R:FR, što predstavlja okidač za izazivanje sindroma izbegavanja senke. Posledica ovakvog odgovora kod biljaka je izduživanje hipokotila, dok se razviće listova i korenova inhibira (Casal, 2013; Pierik & de Wit, 2014; Pedmale *et al.*, 2016; Ballare & Pierik, 2017). Kod *A. thaliana* nizak R:FR tretman je u roku od 1h doveo do povećanja nivoa IAA za 50% (Tao *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012a; Kohnen *et al.*, 2016), jer u uslovima niskog odnosa R:FR fitohromi intereaguju sa PIF7 transkripcionim faktorom, koji indukuje ekspresiju *YUCCA* gena (Yang & Lin, 2017). *YUCCA* geni (*YUC2*, *YUC5*, *YUC8* i *YUC9*) kodiraju za flavin monooksigenazu koja učestvuju u triptofan nezavisnom putu biosinteze auksina (Tao *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012a; de Wit *et al.*, 2015; Kohnen *et al.*, 2016; Müller-Moulé *et al.*, 2016).

Svetlost može da reguliše nivo auksina, utičući i na njegov signalni put. Pokazano je da CRY1 i PHYB mogu direktno da interaguju sa Aux/IAA, inhibirajući na taj način izduživanje hipokotila u momentu de-etiolacije (Kepinski & Leyser, 2005; Calderón-Villalobos *et al.*, 2012). Skorašnja istraživanja ukazuju da ova interakcija dovodi do stabilizacije Aux/IAA proteina i da čak u prisustvu auksina ne dolazi do njegove degradacije (Huq, 2018; Xu *et al.*, 2018). U uslovima visokog intenziteta svetlosti TIR1 receptor ima veći afinitet za vezivanje CRY1-Aux/IAA i PHYB-Aux/IAA kompleksa u odnosu na auksine, čime se onemogućava aktivnost ARF transkripcionog faktora da stimuliše ekspresiju auksinskih gena. Prema tome, fotoreceptori kompetiraju sa auksinima u vezivanju za auksinski receptor, a rezultat kompeticije zavisi od intenziteta svetlosti i količine auksina (Xu *et al.*, 2018). Pored toga, Mao *et al.* (2020) su pokazali da CRY1 i PHYB mogu direktno da intereaguju i sa

ARF transkripcionim faktorima sprečavajući njihovo vezivanje za promotore auksinskih gena, što predstavlja još jedan nivo regulacije signalnog puta auksina u prisustvu B i R svetlosti. Za razliku od toga, u uslovima niskog odnosa R:FR, PHYB učestvuje u stabilizaciji ARF (ARF6, ARF7, ARF 8) čime se stimuliše ekspresija gena koji su odgovorni za pojavu sindroma izbegavanja senke kod biljaka (Reed *et al.*, 2018).

Svetlost utiče i na aktivni polarni transport auksina delujući na PIN i PGP, koji uspostavljaju lokalni gradijent auksina (Grieneisen *et al.*, 2007; Titapiwatanakun & Murphy, 2009). U mladim biljkama pod uticajem svetlosti dolazi do uspostavljanja ravnoteže u nivou auksina između izdanka i korena, što je ključno za kordinisano razviće ovih organa (Halliday *et al.*, 2009). Hipokotil je centralni organ koji učestvuje u komunikaciji između izdanka i korena, pri čemu se komunikacija ostvaruje zahvaljujući postojanju polarnog aktivnog transporta auksina. U etioliranim klijancima *A. thaliana* prisutna je niska ekspresija *PIN1* gena, koja se značajno povećava nakon izlaganja klijanaca R i B svetlosti (Sassi *et al.*, 2012, 2013), što ukazuje da svetlost u procesu de-etiolacije kontroliše transport auksina uglavnom putem regulacije *PIN1* u hipokotilu. Slično tome, pokazano je da B svetlost u fototropskoj reakciji, kao i uslovi niskog odnosa R: FR dovode do akumulacije *PIN3* u ćelijama hipokotila koje su direktno izložene svetlosnom signalu (Ding *et al.*, 2011; Keuskamp *et al.*, 2010; Kohnen *et al.*, 2016). Fototrpska reakcija je posredovana receptorima fototropinima i predstavlja asimetričano rastejanje organa, što za posledicu ima savijanje hipokotila ka izvoru svetlosti (Christie, 2007). Akumulacija *PIN3* pod uticajem B svetlosti na osvetljenoj strani hipokotila dovodi do efluksa auksina i njegove akumulacije na zamračenoj strani, usled čega dolazi do asimetričnog rasta hipokotila i njegovog savijanja ka izvoru svetlosti (Vieten *et al.*, 2007; Friml, 2010). B svetlost i nizak odnos R:FR indukuju ekspresiju gena *D6 PROTEIN KINASE (D6PK)* i *D6PKL1*, čija je uloga u fosforilaciji *PIN3*, što je neophodno za njegovu akumulaciju u prisustvu svetlosti (Keuskamp *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2014; Kohnen *et al.*, 2016; Ma & Li, 2019). Pored *PIN3*, B svetlost utiče i na akumulaciju *ATP-binding cassette B (ABCB)* transportera, ali mehanizam kojim se to odvija nije poznat (Ge *et al.*, 2017).

Svetlost ne utiče na transport auksina samo u nadzemnim delovima biljke, već utiče i na njegov transport u korenovima, iako oni nisu direktno izloženi uticaju svetlosti. Pokazano je da u ovom slučaju izdanci vrše percepciju svetlosti, šaljući signale do korenova što dovodi do akumulacije *PIN1* i *PIN2* u apikalnom meristemu korena (Sassi *et al.*, 2012). Ekspresija *PIN1* i *PIN2* je regulisana aktivnošću *COP1*. U uslovima mraka *COP1* vrši degradaciju *HY5*, čime se vrši represija *PIN1* i *PIN2* gena, dok u uslovima svetlosti je povećana aktinost *HY5* koji stimuliše ekspresiju ovih gena (Chen *et al.*, 2016b; van Gelderen *et al.*, 2018) Na ovaj način lokalizacija i distribucija *PIN1* i *PIN2* u apikalnom meristemu korenova pod uticajem svetlosti dovodi do proliferacije i elongacije ćelija korena.

1.2.9. Interakcija giberelina sa drugim fitohormonima

Rastejanje i razviće biljaka je regulisano kompleksnom mrežom signalnih puteva različitih fitohormona, koja je formirana još tokom ranih faza evolucije, najverovatnije zbog prisustva mnogih ograničenja koje biljke poseduju kao sesilni organizmi (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2012). Fitohormoni utiču na skoro svaki aspekt životnog ciklusa biljaka u saglasnošću sa faktorima spoljašnje sredine. Dejstvo GA na neki specifičan fiziološki proces uglavnom zavisi od interakcije sa drugim hormonima. Priroda interakcije (sinergizam ili antagonizam) GA i drugih hormona zavisi od tipa fiziološkog procesa, mesta njihovog delovanja, stadijuma razvića u kojem se biljka nalazi, kao i od faktora spoljašnje sredine (Weiss & Ori, 2007; Ross *et al.*, 2011, 2016; Banerjee & Roychoudhury, 2019).

Ipak, interakcije između fitohormona su veoma složene i često je veoma teško utvrditi da li se one odvijaju na nivou metabolizma ili signalnih puteva fitohormona.

Jedan od najjasnijih efekata jednog hormona na nivo drugog je povećanje nivoa GA₁ u prisustvu auksina. Iako su mnoga istraživanja pokazala da auksini utiču na biosintezu i signalni put GA, (Weiss & Ori, 2007; Ross *et al.*, 2000, 2003, 2011, 2016), GA u znatno manjoj meri utiču na nivo auksina stimulisući njegov polaran transport (Björklund *et al.*, 2007; Willige *et al.*, 2011; Löffke *et al.*, 2013). Sinergistički efekat auksina i GA se ogleda u regulaciji ćelijske ekspanzije i diferencijacije tkiva. U jednom od prvih istraživanja interakcije GA i auksina je pokazano da egzogeno dodata 4-hlor indol sirćetna kiselina (4-Cl-IAA), kao i prisustvo semena, stimulisu transkripciju *GA20-ox* u mahunama graška (Huizen *et al.*, 1997). Pozitivan uticaj semena na povećanje ekspresije gena *GA20-ox* objašnjava se time što seme prirodno sadrži 4-Cl-IAA (Ozga *et al.*, 2009; Magnus *et al.*, 1997). Nakon toga su usledila mnogobrojna istraživanja koja su pokazala da IAA indukuje ekspresiju *GA20-ox* i *GA3-ox* i inhibira ekspresiju *GA2-ox* kod mnogih biljnih vrsta kao što su: grašak (Ross *et al.*, 2000), duvan (Wolbang & Ross, 2001), ječam (Wolbanget *et al.*, 2004) i *A. thaliana* (O'Neill *et al.*, 2010). Povećanje GA₁ i izduživanje hipokotila je stimulirano nakon egzogene primene IAA kod dekapitovanih biljaka kojima je uklonjen izvor auksina, što ukazuje da GA posreduju u izduživanju ćelija hipokotila zajedno sa auksinima. Kod *A. thaliana*, α -naftalen sirćetna kiselina (NAA) takođe povećava nivo transkripcije *GA20-ox1* i *GA20-ox2*, ali nema efekta na ostale članove iste genske familije (*GA20-ox3* i *GA20-ox4*) i ne utiče na ekspresiju *GA3-ox1* i *GA3-ox2* (Frigerio *et al.*, 2006). Slično tome, auksini stimulisu biosintezu GA tokom sazrevanja plodova (Serrani *et al.*, 2008; Ozga *et al.*, 2009; Bermejo *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2018b).

Skorašnja istraživanja ukazuju da DELLA proteini mogu da interaguju sa ARF transkripcionim faktorima, inhibirajući na taj način ekspresiju gena koju indukuju auksini tokom sazrevanja plodova (Oh *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2018b). U prisustvu auksina formiranje kompleksa DELLA-ARF inhibira ekspresiju gena koji učestvuju u sazrevanju plodova, ali stimulise ekspresiju *GA20-ox* i *GA3-ox*. Pored toga, DELLA-ARF stimulise ekspresiju *Gh3* koji je odgovoran za degradaciju auksina (Hu *et al.*, 2018b). Navedeno ukazuje da u slučaju sazrevanja plodova auksini povećavaju nivo GA utičući na njegov signalni put, ali i da GA mogu da utiču na nivo auksina modulacijom ekspresije *Gh3*.

GA mogu da utiču na nivo auksina, stimulisući njegov polaran transport. Pokazano je da su GA odgovorni za asimetričnu distribuciju auksina u fototropskoj reakciji (Willige *et al.*, 2011; Löffke *et al.*, 2013). Willige *et al.* (2011) ukazuju da je protein koji je potreban za upućivanje PIN u vakuole regulisan DELLA proteinima i da se na taj način asimetričan obrazac ekspresije *PIN* moduliše nivom GA. Takođe, interakcija GA, ABA i auksina inhibira izduživanje lateralnih korenova, što se može objasniti modifikacijom polarnog transporta auksina (Duan *et al.*, 2013).

DELLA proteini učestvuju u inhibiranju izduživanja hipokotila u momentu de-etiolacije biljaka interagujući direktno sa transkripcionim faktorima koji su deo signalnih puteva auksina i brasinosteroida. U odsustvu GA, DELLA proteini interaguju sa ARF, PIF4 i *BRASSINAZOLE RESISTANT1* (BZR1) transkripcionim faktorima, sprečavajući njihovo vezivanje za promotore ciljnih gena, čime se inhibira izduživanje hipokotila (Bai *et al.*, 2012; Gallego-Bartolomé *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012b; Oh *et al.*, 2014). Brasinosteroidi i GA sinergistički interaguju tokom indukcije cvetanja. Pokazano je da BZR1 indukuje ekspresiju *GA20-ox*, čime se povećava nivo GA koji je neophodan za stimulaciju cvetanja (Unterholzner *et al.*, 2015; Bao *et al.*, 2020). DELLA interaguju sa transkripcionim faktorima iz grupe *ETHYLENE RESPONSE FACTOR*, koji indukuju biosintezu etilena, regulišući na taj način razviće apikalne kuke u mraku (An *et al.*, 2012; Marín-de la Rosa *et al.*, 2014).

DELLA proteini mogu da interaguju i sa signalnim putevima ABA u kojima najčešće ostvaruju antagonističke efekte. GA podstiču klijanje semena i cvetanje, dok ABA inhibira te procese (Nelson *et al.*, 2009; Finkelstein *et al.*, 2008; Vishal & Kumar, 2018; Tuan *et al.*, 2018; Bao *et al.*, 2020). U uslovima koji su nepovoljni za klijanje semena (uslovi mraka, visoka temperatura) DELLA proteini interaguju sa transkripcionim faktorima iz grupe *ABA INSENSITIVE FACTOR* čime se povećava nivo ABA, koja onda utiče na smanjenje GA, inhibirajući ekspresiju *GA3-ox* i stimulišući ekspresiju *GA2-ox* (Piskurewics *et al.*, 2008; Vishal & Kumar, 2018; Tuan *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019b). Interakcija GA, ABA i etilena se najbolje može uočiti tokom naglog izduživanja biljke u slučaju potpunog potapanja, kada se biljka nalazi u anoksičnim ili hipoksičnim uslovima, u kojima dolazi do povećane produkcije etilena. Nagomilani etilen dovodi do smanjenja količine ABA i povećanja biosinteze GA (Benschop *et al.*, 2005; Vriezen *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2017).

GA i citokinini ostvaruju antagonističke efekte u mnogim fiziološkim procesima (Yanai *et al.*, 2005; Achard *et al.*, 2009). Povećanje nivoa citokinina inhibira ekspresiju *GA20-ox*, ali stimuliše ekspresiju *GA2-ox* (Fonouni-Farde *et al.*, 2017). Sa druge strane, DELLA proteini interaguju sa ARR transkripcionim faktorom, modulišući signalni put citokinina (Moubayidin *et al.*, 2010; Marín-de la Rosa *et al.*, 2015).

1.3. Spanać

Spanać je diploidna, diecka biljna vrsta koja pripada familiji *Amaranthaceae* (Morelock & Correll, 2008). Njegovo poreklo i domestifikacija još uvek nisu u potpunosti poznati (Andersen & Torp, 2011). Veruje se da je poreklom iz Persije (Hu *et al.*, 2007; Morelock & Correll, 2008), a rani arheobotanički zapisi ukazuju da se spanać još u 11. veku uzgajao u Španiji, odakle se kasnije proširio u Francusku i na ostatak Evrope (Hallavant & Ruas, 2014). Danas se prirodno rasprostire od Avganistana do istočnog dela Mediterana (Kondo *et al.*, 1991).

Spanać je jednogodišnja biljka koja u vegetativnoj fazi formira rozetu. Može se uspešno gajiti u mnogim klimatskim predelima, mada su za proizvodnju semena pogodniji predeli sa nižim temperaturama i uslovima dugog dana. Uzgaja se radi listova koji se u ljudskoj ishrani koriste sveži ili termički obrađeni (Le Strange *et al.*, 2003). Listovi spanaća imaju visok sadržaj hranljivih materija, bogati su vitaminima (K, A, C i E, folna kiselina), mineralima (Mg, Mn, Fe) i dijetalnim vlaknima (Shohag *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2016; Roberts & Moreau, 2016). Primena spanaća u ishrani može da spreči pojavu i razvoj hroničnih bolesti, zbog visokog sadržaja jedinjenja koja poseduju antioksidativnu aktivnost (Kim *et al.*, 2016; Roberts & Moreau, 2016; Sah *et al.*, 2017). Spanać se smatra jednim od najbogatijih izvora karotenoida, luteina, koji sprečava pojavu različitih degenerativnih promena očiju izazvanih starenjem (Moeller *et al.*, 2000). Spanać takođe sadrži veliku količinu fenolnih jedinjenja koji imaju antioksidativno, antimikrobno i antifungalno dejstvo. Među najčešće konzumiranim lisnatim povrćem, spanać sadrži 40% više fenolnih jedinjenja nego kupus i 70% više nego zelena salata (Roberts & Moreau, 2016). Spanać sadrži najveću količinu glikoglicerolipida, odmah nakon peršuna, koji inhibiraju proliferaciju kancerogenih ćelija kod ljudi, što ukazuje na izrazito antikancerogeno dejstvo spanaća (Maeda *et al.*, 2011). Pored toga, spanać ima i antiinflamatorna, antiproliferativna i hepatoprotektivna svojstva i pruža zaštitu od gama zračenja (Subhash *et al.*, 2010). Nepovoljne osobine spanaća se ogledaju u visokom sadržaju oksalata koji može dovesti do stvaranja kamena u bubregu (Wang *et al.*, 2015a) i visokog sadržaja nitrata koji mogu dovesti do pojave methemoglobinemije kod novorođenčadi (Santamaria, 2006). Smanjenje oksalata i povećanje korisnih jedinjenja koja se odnose na zdravlje ljudi su važni ciljevi kultivisanja spanaća.

Zbog svog pozitivnog efekta na zdravlje ljudi, poslednjih četrdeset godina kultura spanaća je postala veoma popularna, čime se povećala njegova proizvodnja deset puta (<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>). Danas se spanać kultiviše širom sveta u više od 50 zemalja. Od nedavno se spanać gaji i u staklenicima uz pomoć plovnog sistema, koji omogućava ekonomičnu proizvodnju tokom cele godine i bolji kvalitet biljaka (Öztekin *et al.*, 2018).

Tokom dugotrajnog perioda kulture spanaća selekcionisan je veliki broj sorti i hibrida u cilju povećanja otpornosti spanaća na razne bolesti, povećanja njegove hranjive vrednosti, kao i bolje produktivnosti (Xu *et al.*, 2015b, 2017). Međutim, i pored relativno velikog broja prisutnih sorti u svetu, na domaćem tržištu i u okruženju je najčešće dostupna samo sorta Matador.

Konvencionalno oplemenjivanje je generalno veoma spor proces, posebno kod biljnih vrsta sa složenom determinacijom pola, kao što je spanać (Okazaki *et al.*, 2019). Modernim biotehničkim pristupom, upotrebom kulture *in vitro* i genetičkog inženjeringa, oplemenjivanje ove biljne vrste bi se moglo ubrzati. Međutim, za spanać još uvek ne postoji dovoljno pouzdan i efikasan sistem za regeneraciju *in vitro*, te je neophodno dublje proučavanje ovog problema i dalje razvijanje protokola.

1.3.1. Morfogenezna spanaća u uslovima *in vitro*

Regeneracija spanaća u uslovima *in vitro* je prvi put postignuta od strane naših istraživača (Nešković & Radojević, 1973) prilikom čega je dobijen samo jedan regenerišući kalus. Tek nekoliko decenija nakon toga usledilo je niz publikacija u kojima je opisan veliki broj protokola za indukciju kaulogeneze (Al-Khayri *et al.*, 1991a; Molvig & Rose, 1994; Xiao & Branchard, 1995; Knoll *et al.*, 1997; Geekiyanage *et al.*, 2006) i somatske embriogeneze (Xiao & Branchard, 1993; Komai *et al.*, 1995, 1996a; Zdravković-Korać & Nešković, 1998, 1999). Iako postoje primeri direktne regeneracije adventivnih pupoljaka (Knoll *et al.*, 1997; Gekiyanage *et al.*, 2006) i somatskih embriona (Zdravković-Korać & Nešković, 1998), u većini slučajeva regeneracija spanaća se odvijala indirektnim putem. Na efikasnost regeneracije spanaća u uslovima *in vitro* utiče veliki broj faktora, kao što su: hranjivi sastojci u medijumu (mikro- i makronutrijenti, BRR, vitamini, šećeri), biljni materijal (genotip, tip, veličina i starost eksplanta) i fizički faktori (kvalitet i kvantitet svetlosti, fotoperiod i temperatura).

Još na samom početku istraživanja regeneracije spanaća, veliki broj publikacija je ukazao na vrlo varijabilan potencijal sorti spanaća za kaulogenezu i somatsku embriogenezu, ističući genotip kao jedan od najznačajnijih faktora (Al-Khayri *et al.*, 1991a; Komai *et al.*, 1996a; Knoll *et al.*, 1997; Zhang & Zeevart, 1999). Poređenjem potencijala za formiranje adventivnih pupoljaka iz listova klijanaca četiri sorte spanaća, Al-Khayri *et al.* (1991a) su pokazali da je procenat regeneracije varirao od 2.4-32.5%, dok je u slučaju embriogenog potencijala odsečaka korenova 8 sorti spanaća takođe uočena velika varijabilnost koja je iznosila od 17-78 % (Komai *et al.* 1996a). Da genetički faktor ima snažan uticaj na efikasnost regeneracije kod spanaća ukazuje postojane velike varijabilnosti u regenerativnom odgovoru ne samo sorti već i individua u okviru iste sorte (Ishizaki *et al.*, 2001; Milojević *et al.*, 2011). Frekvencija regeneracije individua je varirala 0 % - 80 % kod sorte Nippon (Ishizaki *et al.*, 2001) i 0 % - 100 % kod sorte Matador (Milojević *et al.*, 2011). Sorte Matador, koja je korišćena u ovom radu zbog najvećeg ekonomskog značaja na domaćem tržištu, ima veoma nizak regenerativni potencijal (Milojević *et al.*, 2011). Nizak regenerativni potencijal sorte Matador se može objasniti činjenicom da su jedinke sa visokim regenerativnim potencijalom retke u populacijama ove sorte (Milojević *et al.*, 2011). Međutim, Milojević *et al.* (2011) su uspešno povećali frekvenciju regeneracije individua sorte Matador sa 40% na 100%, samoukrštanjem jedinki sa srednjim embriogenim potencijalom. Navedeno istraživanje ukazuje da se embriogeni potencijal nekih jedinki može povećati samooplođenjem i da se na taj način mogu dobiti superiorne jedinke polazeći od jedinki sa skromnim embriogenim potencijalom (Milojević *et al.*, 2011). Pored toga, pokazano je da brzina kojom eksplantati odgovaraju

takođe genetički determinisana, jer jedinke sa visokim embriogenim potencijalom značajno brže regenerišu i ta osobina se konstantno održava u potomstvu (Milojević *et al.*, 2011).

Tip i starost eksplantata značajno utiče na efikasnost regeneracije kod spanaća. Mlada biljna tkiva imaju veći regenerativni kapacitet u poređenju sa starijim, pa su se za indukciju regeneracije spanaća najčešće koristili organi klijanaca (Al-Khayri, 1997). Zhang & Zeevaart (1999) su pokazali da su kotiledoni izolovani sa klijanaca starih 5 dana bili optimalni za indukciju regeneracije, jer su mlađi kotiledoni propadali, a kod starijih se nije mogla indukovati regeneracija. Iako su za indukciju kaulogeneze i somatske embriogeneze spanaća korišćeni brojni eksplantati: odsecci kotiledona (Komai *et al.*, 1996a; Zhang & Zeevaart, 1999; Geekiyana *et al.*, 2006), hipokotila (Xiao & Branchard, 1993, 1995; Zdravković-Korać & Nešković, 1993, 1998; Komai *et al.*, 1996a), korenova (Komai *et al.*, 1996a; Knoll *et al.*, 1997; Ishizaki *et al.*, 2001; Milojević *et al.*, 2011) i listova biljaka gajenih *ex vitro* (Zdravković-Korać & Nešković, 1993, 1998) i *in vitro* (Komai *et al.*, 1996a; Bao *et al.*, 2009; Chin *et al.*, 2009) neki su se pokazali superiornijim u odnosu na druge. Komai *et al.* (1996a) su pokazali da korenovi poseduju najveću frekvencu regeneracije (75%), u poređenju sa hipokotilom (28%) i bazalnim delom kotiledona (16%) koji su najčešće obrazovali kalus, dok se iz distalnih delova kotiledona i listova nije mogla indukovati regeneracija. Stoga korenovi su najčešće korišćeni eksplantati za indukciju kaulogeneze i somatske embriogeneze, posebno apikalni fragmenti lateralnih korenova, za koje je pokazano da imaju značajno veći regenerativni potencijal od srednjih i bazalnih odsečaka (Xiao & Branchard, 1995; Komai *et al.*, 1996a; Knoll *et al.*, 1997).

Primena različitih tipova i koncentracije BRR predstavlja jedan od najvažnijih faktora za indukciju kaulogeneze i somatske embriogeneze kod spanaća. Kao i kod većine drugih biljnih vrsta, prisustvo auksina je bilo neophodno za indukciju oba procesa kod spanaća, te su ispitivani različiti tipovi auksina, vrlo često u visokim koncentracijama (Xiao & Branchard, 1993, 1995; Komai *et al.*, 1996b; Knoll *et al.*, 1997). Za indukciju kaulogenog kalusa iz odsečaka listova spanaća, najefikasnija je bila primena 2,4-D u koncentraciji 2.62 μM (Al-Khayri *et al.*, 1991a, b, c, d). Kasnije su Molvig & Rose (1994) potvrdili ulogu 2,4-D u indukciji kaulogenog kalusa iz različitih tipova eksplantata (kotiledoni, hipokotili, korenovi), testirajući brojne auksine: IAA, NAA, *para*-hlorfenoksisirćetnu kiselinu (*p*CPA) i 2,4-D. Kalus se formirao u prisustvo svih auksina, međutim samo kalus koji je gajen na medijumu sa 2,4-D je imao sposobnost regeneracije pupoljaka (Molvig & Rose, 1994). Slično tome, za indukciju embriogenog kalusa, ispitivani su različiti auksini IAA, IBA, 2,4-D i NAA u širokom opsegu koncentracija od 0.1 μM do 100 μM (Komai *et al.*, 1996b). Bez obzira na tip i koncentraciju auksina, dolazilo je do formiranja kalusa, ali je izostala regeneracija somatskih embriona. Uključivanje citokinina, najčešće kinetina, u protokole zajedno sa auksinima je stimulisalo formiranje somatskih embriona (Zdravković-Korać & Nešković, 1993, 1998), dok u nekim slučajevima citokinini su inhibirali regeneraciju pupoljaka (Knoll *et al.*, 1997). Ipak u najvećem broju studija tretiranje ekplantanata različitim kombinacijama citokinina i auksina dovela je do niske frekvence regeneracije somatskih embriona i pupoljaka (Xiao & Branchard, 1995; Komai *et al.*, 1996b), dok je u većoj meri uticala na povećanje proliferacije kalusa (Nešković & Radojević, 1973; Al-Khayri *et al.*, 1992a; Xiao & Branchard, 1993; Al-Khayri 1997). Za efikasnu indukciju somatske embriogeneze i kaulogeneze u skoro svim studijama je bilo neophodno prisustvo GA₃ (Al-Khayri *et al.*, 1991a,b,c,d, 1992a; Molvig & Rose, 1994; Knoll *et al.*, 1997; Komai *et al.*, 1996a,b). Xiao & Branchard (1993) smatraju da je uloga GA₃ da inhibira proliferaciju kalusa, dok stimuliše regeneraciju pupoljaka. Iako su u pojedinim studijama korišćene visoke koncentracije GA₃ (100 μM) za indukciju kaulogeneze iz hipokotila i odsečaka korenova (Xiao & Branchard, 1995), u većini slučajeva za indukciju oba procesa kod spanaća 0.1-10 μM GA₃ su bile optimalne koncentracije (Molvig & Rose, 1994; Xiao & Branchard, 1993; Komai *et al.*, 1996a, b; Knoll *et al.*, 1997). Molvig & Rose (1994) smatraju da je za efikasnu

regeneraciju spanaća neophodna interakcija auksina i GA, u kojoj auksini indukuju formiranje meristemskih ćelija, dok GA stimuliše razviće primordija. U skladu sa tim u najvećem broju protokola GA₃ je kombinovan sa auksinima, pre svega sa 10-30 μM NAA (Xiao & Branchard, 1993; Komai *et al.*, 1996a,b; Knoll *et al.*, 1997; Ishizaki *et al.*, 2001). Za razliku od toga, primena drugih BRR za indukciju regeneracije kod spanaća je značajno ređa. ABA je u niskim koncentracijama (1 μM) stimulisala indukciju i razviće somatskih embriona, dok je u višim koncentracijama (4μM) inhibirala dalje razviće globularnih embriona, verovatno delujući stresno na biljno tkivo (Zdravković-Korać & Nešković, 1999). Ishizaki *et al.* (2000) su ukazali na pozitivan efekat etilena u kombinaciji sa GA₃ u indukciji embriogenog kalusa. Smatra se da u ovom slučaju etilen povećava osetljivost ćelija na GA₃ (Ishizaki *et al.*, 2000).

Primena različitih formulacija mikro i makroelemenata je značajno uticala na efikasnost regeneracije kod spanaća. Indukcija somatske embriogeneze iz korenova spanaća bila je najefikasnija na medijumu koji je sadržao Nitsch (1969) ili MS/2 mineralni rastvor (Komai *et al.*, 1996a). Iako su se somatski embrioni formirali na medijumu koji je sadržao MS, B5 (Gamborg *et al.*, 1968) i SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) mineralne rastvove, frekvencija regeneracije je bila veoma niska, dok je ova pojava izostala na medijumu koji je sadržao White (White, 1943) mineralni rastvor. Pokazano je da prisustvo neorganskog azota u obliku nitrata, ali i odnos između nitrata i amonijuma utiče na indukciju somatske embriogeneze. Optimalna koncentracija nitrata je bila 30 mM, dok veće koncentracije (60-100 mM) su inhibirale formiranje somatskih embriona. Odnos 2:1 nitrata i amonijuma je značajno povećao frekvenciju regeneracije somatskih embriona, ali nije uticao na indukciju kalusa (Komai *et al.*, 1996a). U skoro svim navedim protokolima, 2-3% saharoza je bila najčešći korićen šećer za indukciju kalusa i regeneraciju spanaća (Molvig & Rose, 1994; Xiao & Branchard, 1993; Komai *et al.*, 1996a, b; Knoll *et al.*, 1997; Al-Khayri *et al.*, 1991a, b, c, d). U pojedinim studijama je pokazano da primena fruktoze u niskim koncentracijama (29 mM) povećava frekvenciju regeneracije somatskih embriona kod spanaća, dok primena manoze, sorboze ili laktoze u bilo kojim koncentracijama inhibira ovaj proces (Komai *et al.*, 1996c). U cilju poboljšanja *in vitro* regeneracije spanaća testirani su različiti tipovi jedinjenja ekstrakata. Dodavanje 15% kokosovog mleka u medijum je povećalo frekvenciju regeneracije pupoljaka sa 15% na 41% iz odsečaka listvova dve sorte spanaća (Al-Khayri *et al.*, 1992b). Zanimljive rezultate su dobili Milojević *et al.* (2012a) primenom higromicina, antibiotika koji se često koristi za selekciju transformisanih biljkaka. U niskim koncentracijama (0.5 mg/l) higromicin je poboljšao efikasnost somatske embriogeneze iz korenova spanaća sorte Matador, delujući verovatno kao subletalni stresni faktor (Milojević *et al.*, 2012a).

Na indukciju somatske embriogeneze i kaulogeneze, od fizičkih faktora najveći uticaj imaju intenzitet svetlosti, fotoperiod i temperatura. Dosadašnje studije o uticaju fotoperioda i intenziteta svetlosti na regenerativni kapacitet spanaća su dale kontradiktorne rezultate (Geekyanage *et al.*, 2006, Milojević *et al.*, 2012b). Dok su Geekyanage *et al.* (2006) pokazali da je regeneracija pupoljaka iz kotiledona spanaća bila efikasnija u uslovima KD nego u uslovima DD, somatska embriogeneza iz apikalnih odsečaka korenova svih testiranih linija spanaća je nesumljivo bila efikasnija u uslovima DD nego u uslovima KD (Milojević *et al.*, 2012b). U obe studije optimalni opseg gustine fluksa svetlosti je bio 50-100 μmol m⁻²s⁻¹ (Geekyanage *et al.*, 2006; Milojević *et al.*, 2012b). Iako su u navedenim studijama korićene različite sorte spanaća i drugi tip eksplantata, kontradiktorni rezultati su verovatno posledica različitog uzorkovanja biljnog materijala. Milojević *et al.* (2012b) su koristili genetički identičan materijal na svim tretmanima, dok Geekyanage *et al.* (2006) birali nasumično eksplantate i nisu uzeli u obzir uticaj genotipa koji mora biti eliminisan kako bi se dobili validni rezultati o uticaju drugih faktora na regeneraciju spanaća. U većini studija kulture su gajene na oko 25°C. Međutim, neka

istraživanja su pokazala da je proces kaulogeneze kod spanaća višestruko efikasniji kad se eksplantati gaje na 14°C nego na 25°C (Chin *et al.*, 2009).

1.3.2. Molekularni markeri za praćenje somatske embriogeneze spanaća

Kod mnogih biljnih vrsta pokazano da je ekspresija pojedinih gena (*WUS*, *LEC*, *BBM*) u korelaciji sa sticanjem embriogene kompetencije, pa se oni uspešno koriste kao molekularni markeri za brzu detekciju somatske embriogeneze i pre vidljivih morfoloških promena (Zuo *et al.*, 2002; Stone *et al.*, 2001; Boutilier *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 1997; Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015). Međutim, nijedan od ovih gena nije do sada kloniran kod spanaća. U slučaju spanaća klonirana su i opisana dva ribozom-inaktivirajuća proteina (RIP), *SoRIP1* i *SoRIP2*, koji su izolovani iz embriogenog kalusa spanaća (Ishizaki *et al.*, 2002) i čija je ekspresija bila specifična za različite faze razvića somatskih embriona (Kawade *et al.*, 2008). Niska bazalna ekspresija *SoRIP1* i *SoRIP2* je detektovana u korenovima, neembriogenim kalusima i embriogenim kalusima na početku indukcione faze somatske embriogeneze, dok je njihova snažna ekspresija detektovana u embriogenim kalusima na kraju indukcione faze, kao i u izolovanim somatskim embrionima (Kawade *et al.*, 2008). U promotorskom regionu *SoRIP1* gena pronađen je RY motiv, za koji se vezuju transkripcioni faktori *LEC2* i *WUS*, koji mogu da indukuju somatsku embriogenezu (Zuo *et al.*, 2002; Braybrook *et al.*, 2006), dok je promotorskom regionu *SoRIP2* gena otkriven *cis* element koji je u korelaciji sa odbranom biljaka u uslovima stresa (Kawade & Masuda 2009). Iako RIP proteini nemaju ulogu u indukciji i razviću somatskih embriona, pokazano je da njihova ekspresija koincidira sa pojavom somatskih embriona (Kawade *et al.*, 2008; Milić *et al.*, 2017). Kawade *et al.* (2008) su detektovali povećanje ekspresije *SoRIP2* od 440 puta u somatskim embrionima 4 nedelje nakon prebacivanja na medijum bez BRR u odnosu na ekspresiju u embriogenom kalusu. Sa daljim razvićem somatskih embriona ekspresija *SoRIP2* se drastično smanjila, da bi na kotiletonarnom stadijumu ekspresija je bila na nivou kontrolnih fragmenata korenova gajenih na medijumu bez BRR (Kawade *et al.*, 2008). Slično tome, ekspresija *SoRIP2* u somatskim embrionima na globularnom stupnju razvića je bila oko 300 puta veća u odnosu na fragmente korenova gajene tokom istog vremenskog perioda na medijumu bez BRR (Milić *et al.*, 2017). Pored toga, pokazano je da genotip ima snažan uticaj na ekspresiju *SoRIP2* gena, koja se neznatno povećava (2.5 puta) kod linija sa niskim regenerativnim potencijalom u poređenju sa linijama sa srednjim (10 puta) i visokim regenerativnim potencijalom (50 puta) (Milić *et al.*, 2017). Navedene studije ukazuju da se ekspresija *SoRIP2* može koristiti kao solidan genetički marker za procenu embriogenog potencijala spanaća (Kawade *et al.*, 2008; Milić *et al.*, 2017).

2. CILJEVI

Glavni cilj ovog rada bio je ispitivanje uticaja giberelina i svetlosti na indukciju somatske embriogeneze iz apikalnih odsečaka korenova spanaća sorte „Matador“, koji su kao izolovani organi gajeni u uslovima *in vitro*.

- U cilju prevazilaženja problema varijabilnosti biljnog materijala, izazvane genetičkim i epigenetičkim faktorima, postavljeni su sledeći eksperimentalni zadaci:
 1. Ispitivanje razlika u embriogenom potencijalu eksplantata izolovanih sa nasumično izabranih individua u okviru populacija klijanaca dobijenih isključivanjem semena sorte “Matador” dobijenih od različitih evropskih proizvođača semena,
 2. Razvijanje i testiranje metode uzorkovanja biljnog materijala kojom bi se prevazišla genetička varijabilnost biljnog materijala.
- Histološkom analizom eksplantata tokom indukcije somatske embriogeneze ispitati:
 3. Iz kojih tkiva i ćelija korena regenerišu SE.
- U cilju ispitivanja kojim mehanizmom GA i svetlost indukuju somatsku embriogenezu iz eksplantata, testiran je:
 4. Uticaj 1-10 μM PAC, inhibitora biosinteze GA, u kombinaciji sa 20 μM NAA ili 20 μM NAA + 5 μM GA₃ na embriogeni potencijal eksplantata.
 5. Uticaj 0-5 μM trihostatina (TSA), inhibitora deacetilaze histona, u kombinaciji sa 0, 1, 10 ili 20 μM NAA i 0 ili 5 μM GA₃ na embriogeni potencijal eksplantata.
 6. Uticaj fluorescentne i LED svetlosti različitog opsega talasnih dužina na embriogeni potencijal eksplantata.
- Naredni cilj je bio sprovođenje detaljne analize metabolizma GA u eksplantatima tokom indukcije somatske embriogeneze. U tu svrhu analizirana je:
 7. Ekspresija gena koji kodiraju ključne enzime uključene u biosintezu (*SoGA20-ox1* i *SoGA3-ox1*) i katabolizam (*SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3*) GA u eksplantatima kultivisanim na medijumima sa: 1) 20 μM NAA, 2) 5 μM GA₃, 3) 20 μM NAA+5 μM GA₃ ili 4) na medijumu bez BRR.
 8. Ekspresija navedenih gena u eksplantatima kultivisanim na medijumima sa PAC+NAA, PAC+NAA+GA₃ i NAA+GA₃, kako bi se rasvetlio uticaj PAC na metabolizam GA
 9. Ekspresija navedenih gena u eksplantatima kultivisanim u uslovima različitih svetlosnih tretmana, kako bi se ispitaio uticaj svetlosti različitih talasnih dužina na metabolizam GA.

10. Sadržaj endogenih GA u apikalnim odsečcima intaktnih korenova spanaća, neembriogenim i embriogenim eksplantatima da bi se utvrdila korelacija između metabolizma GA i ispoljavanja embriogenog potencijala eksplantata.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal i uslovi gajenja kultura

3.1.1. Biljni materijal

U ovom radu su korišćena semena spanaća (*Spinacia oleracea* L.) sorte "Matador", koja su nabavljena od proizvođača semena iz Srbije i Evrope, što će biti kasnije precizirano u opisu pojedinačnih eksperimenata.

3.1.2. Sterilizacija semena spanaća

Semena spanaća su isprana 10 min tekućom vodom uz dodatak nekoliko kapi deterdženta (Fairy, "Procter & Gamble", Ohio, USA), a zatim su tretirana 30 min 30% i 15 min 15% rastvorom varikine (4% NaClO, "Panonija", Pančevo, Srbija) i sve vreme mučkana na horizontalnoj mešalici (90 rpm), nakon čega su isprana tri puta sterilnom destilovanom vodom. Semena su osušena na sterilnom filter papiru i isključavana na bazalnom medijumu za gajenje spanaća bez biljnih regulatora rastjenja (BRR), u uslovima dugog dana (DD, 16 h svetlosti/8h mraka). Klijanci su gajeni pod ovim uslovima tokom 2-5 nedelja, koliko je bilo potrebno da razviju 5 listova i bogat korenovm sistem. Na ovom stadijumu razvića su korišćeni kao donor materijal za izolaciju korenova u svim eksperimentima.

Kako bi se odredio procenat klijavosti svake grupe semena, po 20 semena je kultivisano u 5 Petri kutija prečnika 90 mm. Procenat klijavosti je određivan na svakih nedelju dana u periodu od 4 nedelje.

3.1.3. Bazalni medijum za gajenje spanaća

Bazalni medijum (BM) je sadržao MS makro i mikro elemente po recepturi Murashige i Skoog (1962). Sve soli koje su korišćene za pravljanje mineralnih rastvora su nabavljene od kompanije "Lachner" (Brno, Czech Republic). Osim navedenog, BM je sadržao i 20 g/l saharoze, 100 mg/l myo-inozitola, 2 mg/l tiamina, 2 mg/l piridoksina, 5 mg/l nikotinske kiseline, 2 mg/l adenina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i 7 g/l agara ("Torlak", Beograd, Srbija). Pre sterilizacije pH medijuma je podešen na 5.5 uz pomoć pH-metra (Consort C860, Turnhout, Belgium). Sterilizacija medijuma je vršena 25 min na 114°C (80 KPa) autoklaviranjem (Raypa AE75, Barcelona, Spain).

3.1.4. Uslovi gajenja *in vitro* kultura spanaća

Sve kulture su gajene u uslovima DD, na svetlosti fluorescentnih lampi (Philips, Poland), pri gustini fluksa fotona $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, izmerenog koristeći *LI-1400 DataLogger* sa *LI-190SA quantum* senzorom (LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Germany) i na temperaturi $25 \pm 2^\circ\text{C}$, osim u eksperimentu u kome je praćen uticaj svetlosti različitih talasnih dužina na embriogeni potencijal spanaća, gde su navedeni specifični uslovi pod kojima su eksplantati kultivisani.

3.2. Indukcija somatske embriogeneze

Somatska embriogeneza je indukovana iz apikalnih odsečaka (1cm) lateralnih korenova spanaća (u daljem tekstu eksplantati), gajenih na medijumu za indukciju somatske embriogeneze (IMSE), koji je sadržao BM, 20 μM α -naftil-sirćetnu kiselinu (NAA, Sigma-Aldrich) i 5 μM giberelnu kiselinu (GA_3 , Sigma-Aldrich), prema proceduri opisanoj u radu Knoll *et al.* (1997). GA_3 je rastvorena

u 100% etanolu i dodata u prohladen medijum (~40°C) nakon sterilizacije filtriranjem (0.22 µm, Millipore, Merck, Germany).

Subkultivacija eksplantata na IMSE je vršena u intervalima od 4 nedelje, tokom perioda od 12 nedelja, osim u eksperimentu u kome je praćen uticaj svetlosti različitih talasnih dužina na embriogeni potencijal spanaća, što je naznačeno naknadno. Na kraju svake subkulture je vršena kvantifikacija somatskih embriona (SE) uz pomoć stereomikroskopa (Carl Zeiss, Jena, Germany), nakon čega su SE uklonjeni sa eksplantata i kultivisani na BM sa dodatkom 5 µM 6-furfurilaminopurina (kinetin, Kin, Sigma-Aldrich). Na ovom medijumu SE su se razvili u zdrave biljke, koje su se ožiljavale i umnožavale. U cilju sprečavanja cvetanja i završetka vegetativnog razvića, ove biljke spanaća su gajene u uslovima kratkog dana (KD, 8 h svetlosti/16h mraka). Sve biljke koje su regenerisale iz SE poreklom od eksplantata izolovanih sa jednog klijanca predstavljaju jednu liniju. Korenovi biljaka izabranih linija su korišćeni za novi ciklus indukcije regeneracije SE u naznačenim eksperimentima.

U svim eksperimentima embriogeni potencijal eksplantata je procenjen na osnovu tri zavisno promenljiva parametra: frekvence regeneracije (određene kao procenat eksplantata koji regenerišu u odnosu na ukupan broj eksplantata), prosečnog broja SE po eksplantatu i indeksa koji opisuje embriogeni potencijal (EP), koji objedinjuje frekvencu regeneracije i prosečan broj SE po eksplantatu, izračunat po formuli:

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

3.3. Histološka analiza

U svrhu ispitivanja iz kojih tkiva i ćelija korena regenerišu SE, urađena je histološka analiza eksplantata gajenih na IMSE tokom šest nedelja. Uzorci su fiksirani u rastvoru FAA (formalin : sirćetna kiselina : etanol = 10:5:85). Po završenoj fiksaciji, materijal je postupno dehidriran sprovođenjem kroz seriju alkohola rastućih koncentracija. Radi prosvetljavanja tkiva, materijal je postupno sproveden kroz mešavinu 100% alkohola i ksilola, sa rastućim udelom ksilola sve do čistog ksilola. Nakon toga je ksilol postupno zamenjen parafinom, na temperaturi od 58°C. Materijal je ukalupljen u parafinu i sečen na rotacionom mikrotomu na preseke debljine 7 µm. Preseci su nakon deparafinizacije i rehidracije obojeni toluidin plavim (Sakai, 1973) ili kombinacijom alcijan plavo/Schiff reagens (PAS-AB) (Mc Manus & Mowry, 1960). Preparati su snimani na svetlosnom mikroskopu *Zeiss Axiovert* (Carl Zeiss GmbH, Gottingen, Germany).

3.4. Faktori koji utiču na somatsku embriogenezu iz apikalnih odsečaka korenova spanaća

3.4.1. Genotip

Embriogeni potencijal eksplantata je studiran na nivou populacije i individue u okviru populacije. U tu svrhu korišćena su semena spanaća dobijena od devet evropskih proizvođača semena iz: Slovenije (Sl), Poljske (P), Srbije (Sr), Engleske (E), Nemačke (N), Litvanije (L), Ukrajine (U), Rusije (R) i Italije (Tabela 1). Klijanci dobijeni isklijavanjem semena nabavljenih od jednog proizvođača semena smatrani su populacijom. Populacije su obeležene gorenavedenim simbolima za zemlju porekla.

Iz svake populacije je nasumično izabrano 20-30 klijanaca, iz tri partije semena. Svaki klijanac je smatran individualnom linijom. Sa svakog klijanca izolovano je 15-20 odsečaka korenova i postavljeno u 3-4 petri kutije (5 eksplantata po petri kutiji). Postavljeno je ukupno po 400-500

eksplantata za svaku populaciju. Fragmenti korenova su gajeni na IMSE, a kvantifikacija SE je izvršena tokom 12 nedelja kao što je opisano pod 3.2.

Tabela 1 - Spisak proizvođača čija su semena spanaća korišćena u ovom radu.

Proizvođač semena	Zemlja porekla
King Seeds, Colchester	Engleska
Kiepenkerl, Bad Marienberg	Nemačka
Аэлита, Moskow	Rusija
Semenarna, Ljubljana	Slovenja
Nojaus Seklos, Kaunas	Litvanija
NikitovkaSeeds, Slowjansk	Ukrajna
Seme Semena, Beograd	Srbija
W. Legutka, Jutrosin	Poljska
FlorsilvaAnsaloni, Bologna	Italija

Kako bi se procenio embriogeni potencijal populacije, frekvenca regeneracije i prosečan broj SE su izračunati po klijanju. Smatrano je da klijanac odgovara na induktivne uslove, ako je najmanje jedan eksplantat regenerisao SE. Frekvenca regeneracije je izračunata kao udeo klijanaca koji odgovaraju na induktivne uslove u odnosu na ukupan broj testiranih klijanaca. Frekvenca regeneracije je izračunata po biološkom ponavljanju, nakon čega je izračunata srednja vrednost frekvence za svaku populaciju. Frekvenca regeneracije je računata na nedeljnom nivou za svaku od devet testiranih populacija. Prosečan broj SE je izračunat po eksplantatu za vreme ukupnog perioda kultivacije od 12 nedelja, a zatim su izračunate srednje vrednosti broja SE po eksplantatu za svaku populaciju.

Kako bi se procenio embriogeni potencijal individua u okviru populacije, frekvenca regeneracije je izračunata po petri kutiji, dok je prosečan broj SE izračunat po eksplantatu. Frekvenca regeneracije SE iz eksplantata je određena za svaki klijanac u okviru svake populacije, a zatim su ti podaci svrstani u sledeće klase: $n=0$, $1 < n \leq 20\%$, $20 < n \leq 40\%$, $40 < n \leq 60\%$, $60 < n \leq 80\%$ i $80 < n \leq 100\%$ i predstavljeni su kao frekvenca raspodele klijanaca koji pripadaju svakoj od navedenih klasa. Prosečan broj SE po eksplantatu je izračunat za svaki klijanac u okviru svake populacije, podaci su svrstani u odgovarajuću klasu: $n = 0$, $0 < n \leq 1$, $1 < n \leq 10$, $10 < n \leq 20$, i $n > 20$ i frekvenca raspodele klijanaca koji pripadaju svakoj klasi su predstavljene za svaku populaciju.

U svim narednim eksperimentima, urađenim u okviru ove disertacije, korišćeni su klijanci SI populacije, pošto su u ovom eksperimentu pokazali najveći embriogeni potencijal, osim pri testiranju metoda uzorkovanja biljnog materijala opisanom pod 3.4.2.

3.4.2. Testiranje metoda uzorkovanja biljnog materijala

Da bi se procenio uticaj giberelina i svetlosti na embriogeni potencijal eksplantata, testiran je metod za uzorkovanje biljnog materijala, kako bi se anulirao uticaj genotipa na ovu osobinu. Za tu svrhu je korišćen genetički identičan materijal za svaki tretman i kontrolu. To je postignuto tako što je podjednak broj fragmenta korenova izolovanih sa jednog klijanca postavljen na sve tretmane.

Za ovu analizu korišćeni su klijanci iz SI i U populacija, jer su pokazali najveći i najniži embriogeni potencijal u eksperimentu pod 3.4.1. Za obe populacije su korišćeni eksplantati izolovani sa po 20-30 nasumično odabranih klijanaca po biološkom ponavljanju. Eksperiment je urađen u tri biološka ponavljanja (na ukupno 60-90 klijanaca).

U svrhu testiranja ovog modela uzorkovanja biljnog materijala, embriogeni potencijal je procenjen na dva načina: 1) klasičnom kvantifikacijom SE posle 12N gajenja eksplantata na IMSE i 2) merenjem ekspresije gena koji kodira ribozom-inaktivirajući protein (*SoRIP2*), koji se specifično eksprimira na globularnom stadijumu razvića SE, posle 3-8N gajenja eksplantata na IMSE.

Ovaj model uzorkovanja biljnog materijala je korišćen za sve kasnije eksperimente urađene u okviru ove doktorske disertacije.

3.4.3. Inhibitori biosinteze giberelina

Uticaj paklobutrazola (PAC, Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands), inhibitora biosinteze giberelina, na indukciju regeneracije SE iz eksplantata je testiran na eksplantatima izolovanim sa 20 nasumično izabranih klijanaca, uzorkovanih kako je opisano pod 3.4.2, i eksplantatima korenova izolovanih sa biljaka visokoregenerativne linije SI122. Ova linija je dobijena u eksperimentu pod 3.4.1 regeneracijom SE iz eksplantata klijanca br. 122 iz SI populacije. Eksplantati su gajeni na BM sa 20 μM NAA ili 20 μM NAA+5 μM GA₃ u kombinaciji sa 0, 1, 2.5, 5 ili 10 μM PAC. Rastvor PAC je sterilisan filtriranjem (0.22 μm , Merck Millipore) i dodat u autoklaviran medijum ohlađen na oko 40°C, pod aseptičnim uslovima. Za svaki tretman su postavljene tri petri kutije sa po 10-15 eksplantata (n=30-45). SE su kvantifikovani pomoću stereomikroskopa na 4 nedelje, tokom perioda od 12 nedelja, kako je opisano pod 3.2.

3.4.4. Trihostatin

Testiran je uticaj 0, 0.1, 0.5, 1 ili 5 μM trihostatina (TSA, Sigma-Aldrich) u kombinaciji sa 0, 1, 10 ili 20 μM NAA i 0 ili 5 μM GA₃ na embriogeni potencijal eksplantata. Eksplantati su bili izloženi dejstvu TSA tokom 1, 7 ili 14 dana, posle čega su subkultivisani na medijum istog sastava bez TSA. TSA je rastvoren u DMSO tako da je finalna koncentracija DMSO u svim medijumima bila 0.5 $\mu\text{l/ml}$ (0.05%). Ista količina DMSO je dodata i u kontrolni medijum bez TSA.

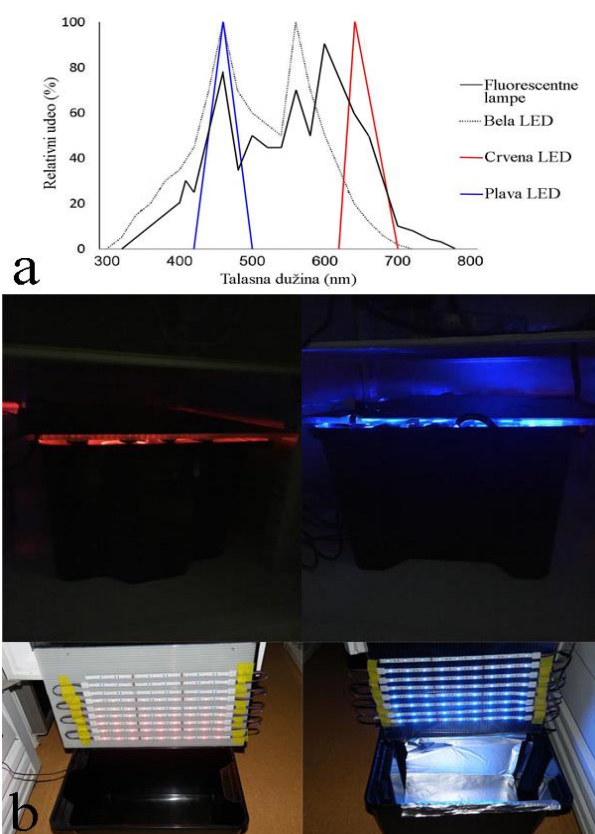
Za svaki NAA/GA₃ tretman je postavljen jedan eksperiment u kome je varirana koncentracija i dužina TSA tretmana koristeći ustanovljenu metodu uzorkovanja. Za svaki eksperiment je postavljena kontrola za testiranje embriogenog potencijala kultivacijom eksplantata na IMSE. Da bi se ustanovio uticaj DMSO na embriogeni potencijal eksplantata, kontrolni eksplantati su kultivisani na IMSE bez DMSO ili sa 0.05% DMSO u trajanju 1, 7 ili 14 dana. Osim toga, za svaki eksperiment je postavljena i druga kontrola za datu NAA/GA₃ kombinaciju bez DMSO i TSA.

U okviru jednog eksperimenta, uključujući i sve kontrole, korišćeni su korenovi izolovani sa 30 klijanaca (po 1 koren za svaki tretman). U svim eksperimentima, eksplantati su kultivisani u petri kutijama prečnika 5.5 cm. Pet petri kutija sa po 6 eksplantata je postavljeno po tretmanu (n=30). Eksplantati kultivisani na IMSE su korišćeni za poređenje rezultata, da bi se eksperimenti za koje je

korišćen genetički različit materijal mogli međusobno upoređivati. SE su kvantifikovani posle 8 i 12 nedelja pomoću stereomikroskopa.

3.4.5. Svetlost

Uticaj svetlosti različitih oblasti vidljivog spektra na regeneraciju SE iz eksplantata je testiran na eksplantatima izolovanim sa 30 klijanaca nasumično odabranih iz populacije, prema modelu opisanom pod 3.4.2. Eksplantati su gajeni na IMSE u mraku ili u uslovima osvetljenja dva različita izvora svetlosti: 1) florescentnih lampi (FL, Philips, Poland), koje emituju svetlosti u intervalu 380-680 nm, sa maksimumima emisije u oblasti plavog i zelenog dela spektra (Sl. 4a.) i 2) LED (*Light-Emitting Diode*) lampi (Waveform lighting, Vancouver, USA) koje emituju svetlost iz oblasti plavog (B, sa maksimumom emisije na 460 nm) i crvenog (R, sa maksimumom emisije na 630 nm) dela spektra, kao i bele (W) LED svetlosti, sa intervalom emisije 300-720 nm (Sl. 4a). Gustina fluksa fotona W ($16 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), B ($10.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), R ($8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i FL ($17 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) svetlosti je izmeren instrumentom *LI-1400 Data Logger* sa *LI-190SA quantum* senzorom. Spektri FL i LED lampi su prikazani na Sl. 4a. Eksplantati koji su bili izloženi svetlosti LED lampi su gajeni u specijalno dizajniranim komorama za kultivaciju biljaka (Sl. 4b). Svi eksplantati su kultivisani na temperaturi $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Indukcija regeneracije je izvršena prema protokolu opisanom pod 3.2, osim što eksplantati nisu subkultivisani na svež medijum. Za svaki tretman su postavljene tri petri kutije sa po 15 fragmenta korenova ($n=45$). Kvantifikacija SE je izvršena uz pomoć stereomikroskopa nakon 8 nedelja.



Slika 4. a) Emisioni spektri FL i LED lampi koje su korišćene u eksperimentu. **b)** Komore sa B i R LED svetlošću. Adaptirano prema Bello Bello *et al.* (2017).

3.5. Statistička analiza podataka

U svim eksperimentima kulture su nasumično poređane na polici i njihov raspored je menjan tokom eksperimenta (eng. *Completely Randomized Design* - CRD). Da bi se postigla normalna distribucija podataka, procentualni podaci su pre statističke analize podvrgnuti angularnoj transformaciji ($\arcsin\sqrt{X}$), dok su podaci za broj SE transformisani kvadratnim korenovanjem. Kolmogorov-Smirnov test je korišćen za ispitivanje normalne raspodele podataka. Nakon analize dobijeni rezultati su transformisani odgovarajućim inverznim funkcijama i kao takvi prikazani. Kako bi se procenila statistička značajnost uticaja populacije i individua na embriogeni potencijal, korišćena je *nested* ANOVA. Efekat doprinosa populacije i individua varijansi vrednosti zavisnih varijabli (frekvence regeneracije, prosečnog broja SE po eksplantatu i indeksa EP) je procenjen korišćenjem *partial Eta-squared* ($P\eta^2$) vrednosti (Cohen 1973; Sechrest & Yeaton 1982). Statistička značajnost između populacija i između različitih svetlosnih tretmana je testirana primenom *one-way* ANOVA, dok je statistička značajnost za uticaj PAC i TSA na embriogeni potencijal eksplantata testirana uz pomoć *factorial* ANOVA. Statistička značajnost između srednjih vrednosti je testirana uz pomoć Fisherovog *LSD post-hoc* testa ($p \leq 0.05$). Za procenu uticaja DMSO na regeneraciju SE, u okviru svake NAA/GA₃ kombinacije, svaki TSA tretman je upoređen sa kontrolnim tretmanom, eksplantatima kultivisanim na medijumu istog sastava bez DMSO i TSA, t testom za zavisne uzorke.

3.6. Analiza ekspresije gena

3.6.1. Izolacija RNK

Ukupna RNK je izolovana prema modifikovanom protokolu Gašić *et al.* (2004), iz apikalnih fragmenata (1 cm) lateralnih korenova spanaća, osim ako nije drugačije naznačeno.

Sve posude koje su korišćene za izolaciju RNK su prethodno tretirane 12 h 0.1 % rastvorom dietil pirokarbonata (DEPC) u vodi, čija je uloga da inhibira dejstvo RNK-aza, nakon čega su sterilisani u autoklavu (25 min, 114°C, 80 KPa) i korišćeni u daljem radu. Svi rastvori koji su korišćeni za ovu proceduru su napravljeni od 0.1 % vodenog rastvora DEPC, koji je tretiran kao što je naznačeno.

Tabela 2 - Sastav pufera za ekstrakciju RNK po proceduri Gašić *et al.* (2004)

2 x CTAB ekstrakcioni pufer	Finalna koncentracija
CTAB	2 % (w/v)
PVP K-30 solubilni	2 % (w/v)
TRIS - HCl pH 8	100 Mm
EDTA	25 Mm
NaCl	2 M
Spermidin	0.5 g/l
DEPC H ₂ O	

CTAB- Cetiltrimetilamonijum; PVP- Polivinilpirolidon; TRIS- Trometamin; EDTA - Etilendiamintetrasirćetna kiselina

Procedura za izolaciju RNK je bila sledeća:

- Homogenizovano je 150 mg biljnog tkiva u avanu pomoću tečnog azota.
- U svaki uzorak je dodato 650 µl ekstrakcionog pufera (Tabela 2) i 15 µl β-merkaptoetanol.
- Uzorci su vorteksovani i zatim inkubirani 15 min u vodenom kupatilu na 60°C.
- U uzorke je dodato po 650 µl smeše hloroform:izoamil alkohol (24:1).
- Uzorci su centrifugirani 10 min na 10000 x g na 4°C, čime je RNK izdvojena u supernatantu.
- Ponovljena je ekstrakcija hloroformom i izoamil alkoholom.
- Dodato je 166 µl 7.5M LiCl u svaki uzorak.
- Uzorci su inkubirani na 4°C preko noći.
- Sledećeg dana uzorci su centrifugirani 45 min na 12000 x g na 4°C.
- Supernatant je odbačen, a uzorci su isprani dodatkom 1ml 70% etanola.
- Uzorci su centrifugirani 10 min na 12000 x g na 4°C.
- Supernatant je ponovo odbačen, a uzorci su ostavljeni 5min u laminaru da se osuše.
- RNK je rastvorena u 100 µl vode, nakon čega je dodato 10 µl 3M NaCH₃COOH i 275 µl 70% etanola.
- Uzorci su inkubirani najmanje 1 h na -70°C i nakon toga centrifugirani 45 min na 12000 x g na 4°C uz ponovno odbacivanje supernatanta.
- Ponovljeno je ispiranje etanolom i centrifugiranje uzoraka, kao što je već opisano.
- Uzorci su ostavljeni 10 min da se osuše u laminaru, nakon čega je RNK rastvorena u 50 µl vode i čuvana na -80°C do upotrebe.

3.6.2. Određivanje kvaliteta i kvantiteta RNK

Nakon izolacije RNK, izvršena je provera njenog kvaliteta i kvantiteta. Koncentracija RNK je izmerena pomoću spektrofotometra *Nanodrop* (NanoPhotometer® N60, Implen, Munchen, Germany). Izmerene su apsorbance na 260 nm (A_{260} , koja predstavlja maksimum apsorbance baza nukleinskih kiselina) i 280 nm (A_{280} , na kojoj apsorbuju aromatične aminokiseline proteina). Čistoća RNK je određena na osnovu odnosa apsorbanci A_{260}/A_{280} . Za čiste izolate ovaj odnos se kreće u intervalu 1.8-2.2. Integritet RNK je procenjen elektroforetskim razdvajanjem 1 µg RNK na 1.2% (w/v) agaroznom gelu pri naponu od 75V u trajanju od 1h.

Tabela 3 - Sastav reakcione semeše za tretman DNK-azom

Komponenta	Po reakciji (10 µl)	Finalna koncentracija
10 x DNase I pufer	1 µl	
DNase I (1 U/µl)	1 µl	0.1 U/µl
RNase inhibitor (40 U/µl)	0.25 µl	1 U/µl
RNK (1 µg)	max 6.75 µl	
H ₂ O	do 9 µl	

Kako bi se eliminisala eventualno zaostala DNK, uzorci su tretirani DNK-azom (DNase I, Thermo Scientific, Waltham, MA USA). Sastav reakcione smeše je dat u Tabeli 3. Tretman je trajao 30 min na 37°C u mašini *Mastercycler® nexus Gradient* (Eppendorf, Hamburg, Germany). Nakon isteka ovog vremena, reakcija je zaustavljena dodatkom etilen diamin tetra sirćetne kiseline (EDTA, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) u reakcionu smešu do finalne koncentracije 10 mM i inkubiranjem 10 min na 65°C.

3.6.3. Reverzna transkripcija RNK molekula

Za reakciju reverzne transkripcije (RT), prevođenje RNK u komplementarne jednolančane molekule DNK (cDNK), korišćen je *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies, California, USA). Sastav reakcione smeše, ukupne zapremine 20 µl, je prikazan u Tabeli 4.

U svaku reakcionu smešu dodat je 1 µg ukupnih RNK iz odgovarajućeg uzorka. RT reakcija se odvijala u mašini *Mastercycler® nexus Gradient* (Eppendorf, Hamburg, Germany) u tri koraka, 10 min na 25 °C, 120 min na 37 °C i 5 min na 85 °C.

Tabela 4 - Sastav reakcione smeše za reverznu transkripciju

Komponenta	Po reakciji (20 µl)	Finalna koncentracija
10 x RT pufer	2 µl	1x
25 x dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl	4 mM
10 x RT <i>Random</i> prajmeri	2 µl	1x
<i>Multi Scribe Reverse Transcriptase</i> (50 U/µl)	1 µl	2.5 U/µl
H ₂ O	4.2 µl	

3.6.4. Određivanje nivoa ekspresije gena metodom kvantitativnog RT-PCR (qRT-PCR)

Metodom kvantitativnog RT-PCR (qRT-PCR) određen je nivo ekspresije analiziranih gena u mašini *Quant Studio™ 3 Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems). Reakciona smeša je sadržala 2.5 µl odgovarajuće cDNK, koja je dobijena u prethodno opisanim reakcijama reverzne transkripcije. Sastav reakcione smeše je dat u Tabeli 5. Za svaki gen je korišćena kontrola bez templeta (eng. *Non Template Control-NTC*), koja je umesto 2.5 µl cDNK sadržala istu količinu vode tretirane DEPC-om.

Tabela 5 - Sastav reakcione smeše za qRT-PCR

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

Za svaki gen je izračunata efikasnost reakcije na osnovu standardnih kriva. Standardi su predstavljali seriju razblaženja odgovarajuće cDNK (5x, 10x, 100x i 1000x) koja je uz primenu specifičnih prajmera umnožena u PCR reakciji i izolovana posle elektroforetskog razdvajanja sa 1.2% (w/v) agaroznog gela uz pomoć kita *GeneJet Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific) po uputstvu proizvođača. Broj kopija specifičnog produkta po µl je određen uz pomoć programa <http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>.

Svi uzorci su nanošeni na mikrotitar ploču u triplikatima (tehnička ponavljanja). Za određivanje nivoa ekspresije analiziranih gena korišćena je $\Delta\Delta C_t$ metoda (Livak & Schmittgen, 2001). Ova metoda podrazumeva korišćenje endogene kontrole (referentnog gena sa konstitutivnom ekspresijom) i kalibratora (uzorka u odnosu na koga je određena relativna ekspresija gena). U svim eksperimentima kao endogena kontrola je korišćena ekspresija gena koji kodira α -tubulin (GenBank™ pristupni br. M21414.1; Kawade & Masuda, 2009), čiji su prajmeri prikazani u Tabeli 6. Uzorak u odnosu na koga je predstavljena relativna promena ekspresije (kalibrator) je naznačen u svakom eksperimentu.

Tabela 6 - Sekvence prajmera za amplifikaciju gena za α -tubulin

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

F- forward, R-reverse

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

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

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

C_t uzorka = prosečna C_t vrednost uzorka dobijena korišćenjem prajmera za gen od interesa

C_t eku = prosečna C_t vrednost uzoraka dobijana korišćenjem prajmera za endogenu kontrolu

C_t kal = prosečna C_t vrednost za kalibrator dobijena korišćenjem prajmera za gen od interesa

C_t ekk = prosečna C_t vrednost za kalibrator dobijana korišćenjem prajmera za endogenu kontrolu

R – odnos ekspresije uzorka u odnosu na kalibrator

3.6.5. Ispitivanje metode uzorkovanja biljnog materijala

Za testiranje metoda uzorkovanja biljnog materijala korišćena je, osim konvencionalnog brojanja SE opisanog pod 3.2. i 3.4.2, ekspresija gena *SoRIP2* (GenBank™ pristupni br. AB435547.1; Kawade & Masuda, 2009), koja koincidira sa ranim fazama razvića SE (Milić *et al.*, 2017).

S obzirom da ekspresija gena koji kodiraju proteine sa odbrambenom ulogom, u koje spada i *SoRIP2*, često pokazuju diurnalno variranje, najpre je praćeno diurnalno variranje u ekspresiji *SoRIP2* gena, kako bi se utvrdilo najpogodnije vreme uzorkovanja biljnog materijala. Biljni materijal je uzorkovan kako je opisano pod 3.4.2. Eksplantati su izolovani sa 15 nasumično odabranih klijanaca iz populacije i gajeni 4 nedelje na IMSE. Nakon toga, eksplantati su uzorkovani potapanjem u tečni azot u sledećim vremenskim tačkama tokom dana: u trenutku izlaganja eksplantata svetlosti (vremenska tačka 0) i nakon 4, 8, 12, 16 i 24 h, tj. neposredno pre izlaganja eksplantata svetlosti. Svi uzorci su čuvani na -80°C do izolacije RNK. Ekspresija *SoRIP2* gena je analizirana metodom qRT-PCR. Za amplifikaciju ovog gena korišćeni su prajmeri dati u Tabeli 7 (Kawade & Masuda, 2009). Program za amplifikaciju *SoRIP2* gena je sadržao inicijalnu denaturaciju na 95°C u trajanju od 5 min, zatim 35 ciklusa denaturacije (95°C, 30s), vezivanja prajmera (60°C, 1 min) i elongacije (72°C, 1 min). Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su uzorkovani u vremenskoj tački 0. Eksperiment je urađen u tri biološka ponavljanja, svako u tri tehnička ponavljanja.

Tabela 7 - Sekvence prajmera za amplifikaciju gena *SoRIP2*

Naziv prajmera	Sekvenca (5'-3')	Dužina amplikona (bp)	Izvor
F: <i>SoRIP2</i>	ACCTTCCTAAGTGACATACG	629	Kawade & Masuda, 2009
R: <i>SoRIP2</i>	GCATATACTAACGCAATTGG		

F- forward, R-reverse

Za testiranje metode uzorkovanja biljnog materijala praćenjem ekspresije *SoRIP2* gena, korišćeni su klijanici S1 i U populacija, jer su pokazali najveći i najniži embriogeni potencijal u prethodnom istraživanju. Biljni materijal je uzorkovan kako je opisano pod 3.4.2. Eksplantati su izolovani sa 10 nasumično odabranih klijanaca iz populacije i gajeni 3, 4, 5, 6, 7 ili 8 nedelja na IMSE. Za svaki tretman po 20 eksplantata je kultivisano u tri petri kutije (n=60). Kao kalibrator su korišćeni odsecci korenova gajeni 3 nedelje na IMSE. Eksplantati su uzorkovani 4 h nakon početka izlaganja svetlosti, nakon čega su zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80°C do momenta izolacije RNK.

Za svako biološko ponavljanje paralelno su postavljeni genetički identični eksplantati na IMSE i gajeni u uslovima DD pod FL, radi kvantifikacije SE i procene embriogenog potencijala date grupe klijanaca sa kojih su izolovani eksplantati. Dobijeni podaci su upoređeni sa rezultatima dobijenim na osnovu ekspresije *SoRIP2* gena. SE su kvantifikovani pomoću stereomikroskopa na 4 nedelje, tokom perioda od 12 nedelja (videti 3.4.2.).

3.6.6. Analiza ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina u eksplantatima tokom indukcije somatske embriogeneze

S obzirom da se GA sintetišu samo u mladim delovima biljnih organa, testirano je da li nivo ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam GA značajno različit u eksplantatima veličine 1 mm i 1 cm, kako bi se utvrdila pogodna veličina eksplantata za dalju analizu. Biljni materijal

je uzorkovan kako je opisano pod 3.4.2. Eksplantati su izolovani sa 15 klijanaca nasumično odabranih iz populacije, nakon čega su zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80°C do izolacije RNK.

Analizirana je ekspresija gena koji kodira GA20 oksidazu (*GA20-ox1*, Banka gena, pristupni br. U3330, Wu *et al.*, 1996), GA3-oksidadu (*GA3-ox1*, Banka gena, pristupni br. AF506280.1, Lee & Zeevaart, 2002), kao i tri gena koji kodiraju GA2-oksidadu: *GA2-ox1* (Banka gena, pristupni br. AF506281.1, Lee & Zeevaart, 2002), *GA2-ox2* (Banka gena, pristupni br. AF506282.1, Lee & Zeevaart, 2002) i *GA2ox-3* (Banka gena, pristupni br. AY935713.1, Lee & Zeevaart, 2005) u eksplantatima naznačenih veličina. Ekspresija navedenih gena je analizirana metodom qRT-PCR, a prajmeri korišćeni za njihovu amplifikaciju su dati u Tabeli 8. Prajmeri su dizajnirani korišćenjem *Primer-BLAST* softverskog alata i verifikovani pomoću programa *Net Primer*. Program za amplifikaciju svih navedenih gena je bio kao pod 3.6.5. Korišćenjem gel elektroforeze RT-PCR produkata i analizom krive topljenja posle qRT-PCR reakcije potvrđena je specifičnost svih korišćenih prajmera. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati veličine 1cm. Eksperiment je urađen u tri biološka ponavljanja, svako u tri tehnička ponavljanja.

Tabela 8 - Sekvence prajmera za amplifikaciju gena za *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1*, *SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3*.

Naziv prajmera	Sekvenca (5'-3')	Dužina ampikona	Izvor
F: GA20-ox1	ACTAAACTACTACCCGCCTTGC	282 bp	sopstveni
R: GA20-ox1	GGACACAGAAAGAAAGCCACT		
F: GA3-ox1	CGGGGCTCCAAGTGTTTAGA	164 bp	sopstveni
R: GA3-ox1	CGAGAGACGATGTTGGACCC		
F: GA2-ox1	CAATGGCGGAAGGGCTGAAT	297 bp	sopstveni
R: GA2-ox1	GCAAAGAGTCCCCAACGAGT		
F: GA2-ox2	ACCCATCCACCTCTTTTCGG	377 bp	sopstveni
R: GA2-ox2	ACCTGAAGAGCATCTCCCAC		
F: GA2-ox3	ACCGCACCGTATGTTAGAGG	343 bp	sopstveni
R: GA2-ox3	GGTCAGCTCATCATGCCCC		

U svim daljim istraživanjima su korišćeni apikalni odsecci korenova dužine 1 cm.

Za analizu ekspresija gorenavedenih gena u eksplantatima tokom procesa somatske embriogeneze su korišćeni eksplantati koji su izolovani sa 30 nasumično odabranih klijanaca iz populacije. Eksplantati su gajeni na BM sa 20 μM NAA, 5 μM GA₃, IMSE (20 μM NAA+5 μM GA₃) ili na medijumu bez BRR tokom 24 h, 7, 14 ili 28 dana. Biljni materijal je uzorkovan kako je opisano pod 3.4.2. Kao kontrola korišćeni su apikalni odsecci korenova (1 cm) koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Za svaki tretman su postavljene tri petri kutije (biološka ponavljanja) sa po 30 eksplantata. Korenovi su izolovani u intervalu 4-5 h nakon izlaganja klijanaca svetlosti i postavljeni na medijum odgovarajućeg sastava. Uzorkovanje materijala za analizu ekspresije gena posle isteka tretmana je izvršeno 4h nakon uključivanja svetla potapanjem u tečnom azotu. Svi uzorci su čuvani na -80°C do izolacije RNK.

3.6.7. Uticaj paklobutrazola na ekspresiju gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina u izolovanim odsečcima korenova spanaća

Uticaj PAC na ekspresiju *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1*, *SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3* (u daljem tekstu *GA-ox* geni) je testiran u odsečcima korenova izolovanih sa 20 klijanaca nasumično odabranih iz populacije, uzorkovanim kako je navedeno pod 3.4.2. i 3.6.6. Eksplantati su kultivisani na medijumu sa 20 μM NAA ili IMSE u prisustvu ili odsustvu 2.5 μM PAC tokom 24 h, 7, 14 ili 28 dana. Veličina uzorka, način i vreme uzorkovanja biljnog materijala je kako je opisano pod 3.6.6.

Kako bi se procenio embriogeni potencijal eksplantata za konkretnu grupu klijanaca koja je korišćena u ovom eksperimentu, za svako biološko ponavljane paralelno su postavljeni eksplantati na medijume navedene za ekspresiju gena u okviru ovog eksperimenta. SE su kvantifikovani kako je opisano pod 3.2.

3.6.8. Uticaj svetlosti na ekspresija gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina u eksplantatima

U cilju utvrđivanja uticaja svetlosti u odsustvu GA_3 na ekspresiju *GA-ox* gena u izolovanim korenovima, analizirana je ekspresija ovih gena u eksplantatima posle 4 nedelje kultivacije na medijumu bez BRR, pod FL svetlošću i u uslovima DD, dok su eksplantati kultivisani u uslovima mraka korišćeni kao kontrola.

Kako bi se ispitao istovremeni uticaj $\text{NAA}+\text{GA}_3$ i svetlosti na ekspresiju *GA-ox* gena, ekspresija ovih gena je analizirana u eksplantatima kultivisanim na IMSE tokom 4 nedelje u odnosu na eksplantate kultivisane na medijumu bez BRR, oba pod FL svetlošću i u uslovima DD.

Da bi se ispitalo kojim mehanizmom svetlost stimuliše somatsku embriogenezu kod spanaća, ekspresija 5 *GA-ox* gena je testirana u eksplantatima gajenim na IMSE pod uticajem FL, B i W LED osvetljenja nakon 24h, 7, 14 ili 28 dana. Veličina uzorka, način i vreme uzorkovanja biljnog materijala je kako je opisano pod 3.6.6.

Embriogeni potencijal eksplantata za konkretnu grupu klijanaca koja je korišćena u ovom eksperimentu je procenjen kao pod 3.2.

3.7. Statistička analiza podataka dobijenih ispitivanjem ekspresije gena

Analize ekspresije svih testiranih gena su grafički prikazane kao srednje vrednosti računane na osnovu tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja ($n=9$).

Statistička značajnost podataka dobijenih analizom ekspresije *SoRIP2* gena, ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina prilikom ispitivanja veličine eksplantata i prilikom ispitivanja uticaja svetlosti u eksplantatima gajenim na medijumu bez BRR ili IMSE pod FL svetlošću i u uslovima DD je testirana pomoću t-testa za zavisne uzorke, dok je statistička značajnost podataka za diurnalno variranje ekspresijegena *SoRIP2* i ekspresiju gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina pri različitim tretmanima određena analizom varijanse (ANOVA), a srednje vrednosti su razdvojene na osnovu Fisherovog LSD *post-hoc* testa ($p\leq 0.05$).

3.8. Analiza sadržaja endogenih giberelina

Kvalitativna i kvantitativna analiza sadržaja endogenih GA je izvršena u eksplantatima kultivisanim na BM sa 20 μM NAA ili 20 μM NAA+5 μM GA_3 tokom 24 h i 7 dana. Biljni materijal je

izolovan sa 30 nasumično odabranih klijanaca iz populacije i uzorkovan kako je opisano pod 3.4.2. Kao kontrola su korišćeni apikalni odsecci korenova koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zamrznuti u tečnom azotu. Svi eksplantati su uzorkovani 4h nakon početka izlaganja svetlosti, zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na -80°C do analize endogenih giberelina. Za svaki tretman i kontrolu postavljeno je po 30 fragmenata korenova u tri biološka ponavljanja (n=90).

Za svako biološko ponavljanje je izvršena kvantifikacija embriogenog potencijala eksplantata date grupe klijanaca kako je opisano pod 3.6.8.

Analizirana je koncentracija prekursora, bioaktivnih i neaktivnih metabolita GA (GA₁, GA₃, GA₄, GA₅, GA₆, GA₇, GA₈, GA₉, GA₁₃, GA₁₅, GA₁₉, GA₂₀, GA₂₄, GA₂₉, GA₃₄, GA₄₄, GA₅₁ i GA₅₃) uz pomoć tačne hromatografije visokih performansi (*Ultra Performance Liquid Chromatography* – UPLC) sa sistemom za elektrosprej jonizaciju (*Electrospray Ionization* – ESI) i masenu spektrometriju (*Tandem Mass Spectrometry* – MS), korišćenjem internih standarda – analoga GA obeleženih deuterijumom. Kvantifikacija endogenih giberelina je urađena po metodi opisanoj u radu Urbanová *et al.* (2013).

3.8.1. Ekstrakcija i prečišćavanje giberelina

Ekstrakcija GA je izvršena tako što je 100 mg smrznutog i liofilizovanog biljnog materijala homogenizovano pomoću vibracionog mlina MM301 (Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany) na frekvenciji od 30 Hz u trajanju od 3 min. U svaki uzorak su dodate perle od volframovog karbida veličine 3 mm i 1 ml ekstrakcionog rastvora koji je sadržao 80% acetonitrila (AcCN) i 5 % mravlje kiseline. U svaki uzorak je takođe dodata interna standardna smeša koja je sadržala 50 pmol standarda GA obeleženih deuterijumom (²H₂). Uzorci su ekstrahovani tokom 12 h na 4°C korišćenjem rotatora *Stuart SB3* (Bibby Scientific Ltd., Staffordshire, UK). Nakon toga, uzorci su centrifugirani 10 min na 14000 rpm na 4°C, a dobijeni peleti su ponovo ekstrahovani na isti način 60 min na 4°C. Ekstrakti su upareni korišćenjem koncentratora *Centri Vaps Acid-Resistant* (Labconco Corp., MO, USA).

Prečišćavanje uzoraka je izvršeno uz pomoć spojenih kolona Oasis MCX (150 mg) i Oasis HLB (60 mg) (Waters, Milford, MA, USA), koje su aktivirane i uravnotežene dodatkom 5% metanola. Upareni uzorci su rastvoreni u 3 ml 5 % metanola koji je dodat u kolone koje su prethodno isprane 5.75 mM mravljom kiselinom i 5 % metanolom. GA su eluirani iz HLB kolone uz pomoć 3 ml smeše metanola i dietil-etra u odnosu 20:80. Uzorci su upareni do suva uz pomoć struje azota korišćenjem sistema za uparavanje TurboVaps LV (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). Nakon toga, uzorci su rastvoreni u 50 µl metanola vorteksovanjem i primenom ultrazvučnog kupatila.

U uzorke je dodat 25 mM NH₄HCO₃ do zapremine od 3 ml. Uzorci su zatim naneti na Oasis MAX kolonu, koja je prethodno aktivirana dodatkom 3 ml metanola i uravnotežena sa 6 ml 25 mM NH₄HCO₃. Nakon toga kolona je isprana sa 3 ml AcCN i giberelini su eluirani uz pomoć 3 ml 0.2 mM rastvora mravlje kiseline u AcCN. Uzorci su upareni do suva korišćenjem *Visiprep™ Solid Phase Extraction Vacuum Manifold* sistema (Supelcos, Bellefonte, PA, USA) i čuvani na -20°C do kvantifikacije.

3.8.2. Kvantifikacija endogenih giberelina

Kvantifikacija endogenih GA je urađena na *Acquity UPLC™* sistemu (Waters, Milford, MA, USA). Detektor je bio *Xevos TQ MS triple tandem kvadripol* maseni spektrometar (Waters MS Technologies, Manchester, UK) sa uređajem za elektrosprej jonizaciju (ESI). Za kvantifikaciju GA je korišćena koliziona ćelija *ScanWave™*.

Osušeni uzorci su rastvoreni u 50 μ l mobilne faze, a zatim je urađeno razdvajanje GA injektovanjem 15 μ l svakog uzorka u reverznu fazu UPLC kolone (Acquity CSHs, 2.1 mm x 50 mm, 1.7 μ m; Waters) koja je bila spojena sa ESI-MS/MS sistemom za detekciju.

Razdvajanje GA je urađeno u lineranom gradijentu metanola (A) i 10 mM mravlje kiseline (B) pri protoku od 0.25 ml/min, od 10:90 A:B (v/v) do 60:40 (v/v) tokom 15 min. Na kraju, kolona je isprana 100% metanolom (0.75 ml) i uravnotežena pod inicijalnim uslovima (10:90 A:B, v/v) tokom 2.5 min. Kolona je bila na 40°C. Maseni spektri svih GA su dobijeni kontinuiranom infuzijom 1 mM rastvora metanola pri brzini protoka 15 μ l/min. Parametri za maseni spektrometar su bili podešeni na sledeći način: kapilarni napon 1.5 kV, napon konusa 30 V, temperatura 150°C, temperatura rastvaranja gasa 650°C, protok konusnog gasa 2 l/h, protok gasa za rastvaranje 650 l/h i kolizijska energija 25 eV. Maseni spektri su snimani u režimu praćenja višestrukih reakcija, a vreme zadržavanja svakog kanala je izračunato da obezbedi snimanje 16 tačaka po piksu sa međukanalnim kašnjenjem od 0.1 s. Svi dobijeni podaci su obrađeni pomoću softvera *MassLynx*TM (verzija 4.1, Waters, Manchester, UK).

3.8.3. Statistička analiza podataka dobijenih analizom sadržaja endogenih giberelina

Analiza sadržaja GA je grafički prikazana kao srednja vrednost sadržaja GA izraženog u pg/mg suve mase (DW) bljnog tkiva \pm standardna devijacija izračunata za tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja (n=9).

Statistička značajnost podataka dobijenih analizom sadržaja GA je određivana analizom varijanse (ANOVA), a statistička značajnost između srednjih vrednosti je testirana Fisher-ovim LSD *post-hoc* testom ($p \leq 0.05$).

4. REZULTATI

4.1. Biljni materijal

Semena svih devet populacija koje su testirane u ovom radu su pokazala značajne razlike u pogledu klijavosti, razviću klijanaca i embriogenom potencijalu. Od devet testiranih populacija, semena L populacije su najbrže klijala i klijanci su se najbrže razvijali u biljke. Čak 64,4% semena ove populacije je klijalo u roku od nedelju dana, dok su 100% klijavosti postigla već nakon tri nedelje kultivacije. Suprotno tome, samo 3,7% semena populacije I i 5,9% semena populacije Sl je klijalo nakon jedne nedelje dosegnuvši tek 53%, odnosno 64,4%, klijavosti nakon 4 nedelje. Većina semena iz ostalih populacija je imala 71-74% klijavosti (E, N, R i U), dok su semena P i Sr populacija dostigla 87%, odnosno 90% klijavosti, tokom 4 nedelje kultivacije (Tabela 9).

Tabela 9 - Procenat klijavosti semena dobijenih od 9 evropskih kompanija za proizvodnju semena, koja su korišćena u eksperimentu, i vreme potrebno da biljke dostignu stadijum razvića (5 listova i dobro razvijen korenov sistem) na kome su korišćene za eksperiment. Modifikovano prema Belić *et al.* (2020a).

Populacija	Procenat klijavosti semena				Stadijum razvića biljaka sa 5 listova (dan)
	1 nedelja	2 nedelje	3 nedelje	4 nedelje	
Engleska (E)	45.23±0.42	57.96±0.39	71.38±1.37	73.47±1.73	23.43±0.11
Nemačka (N)	7.87±0.88	43.71±0.59	55.42±0.55	74.70±0.32	31.79±0.22
Rusija (R)	27.79±0.30	51.00±0.13	63.66±0.22	72.10±0.19	26.74±0.21
Slovenija (Sl)	5.87±0.03	40.94±0.08	57.08±0.16	64.37±0.29	34.90±0.35
Litvanija (L)	64.42±0.47	84.42±0.15	100±0	100±0	24.70±0.08
Ukrajna (U)	7.94±0.58	33.51±0.43	55.05±0.2	74.15±0.16	24.62±0.09
Srbija (Sr)	32.68±0.22	56.28±0.67	88.58±0.47	90.40±0.25	22.29±0.07
Poljska (P)	57.05±0.12	72.22±0.13	83.82±0.05	87.09±0.06	33.33±0.21
Italija (I)	3.68±0.62	24.40±0.30	51.37±0.45	53.00±0.03	27.08±0.17

4.2. Faktori koji utiču na somatsku embriogenezu iz apikalnih odsečaka korenova spanaća

4.1.1. Genotip

Razlike u embriogenom potencijalu eksplantata su studirane na nivou populacije i individua u okviru populacija klijanaca dobijenih isključivanjem semena sorte Matador dobijenih od 9 evropskih kompanija za proizvodnju semena. Te razlike su bile statistički značajne prema analizi *nested* ANOVA (Tabela 10). Na frekvencu regeneracije SE je značajno uticao faktor populacije ($P\eta^2 = 0,782$, $p < 0,01$) kao i faktor individue ($P\eta^2 = 0,685$, $p < 0,01$, Tabela 10, Sl. 5a), dok su oba ova faktora imali manji uticaj na prosečan broj SE po eksplantatu ($P\eta^2 = 0,499$, $p < 0,01$ za populaciju, odnosno $P\eta^2 = 0,376$, p

<0,01 za individue), i veliki uticaj na EP indeks ($P\eta^2 = 0,732$, $p < 0,01$ za populaciju i $P\eta^2 = 0,688$, $p < 0,01$ za individue).

Tabela 10 - Analiza varijanse (*nested ANOVA*) za uticaj populacije i individue na frekvencu regeneracije, prosečan broj SE i EP indeks. Eksplantati su izolovani sa klijanaca dobijenih iz semena poreklom iz 9 evropskih kompanija za proizvodnju semena i gajeni na IMSE tokom 12 nedelja.

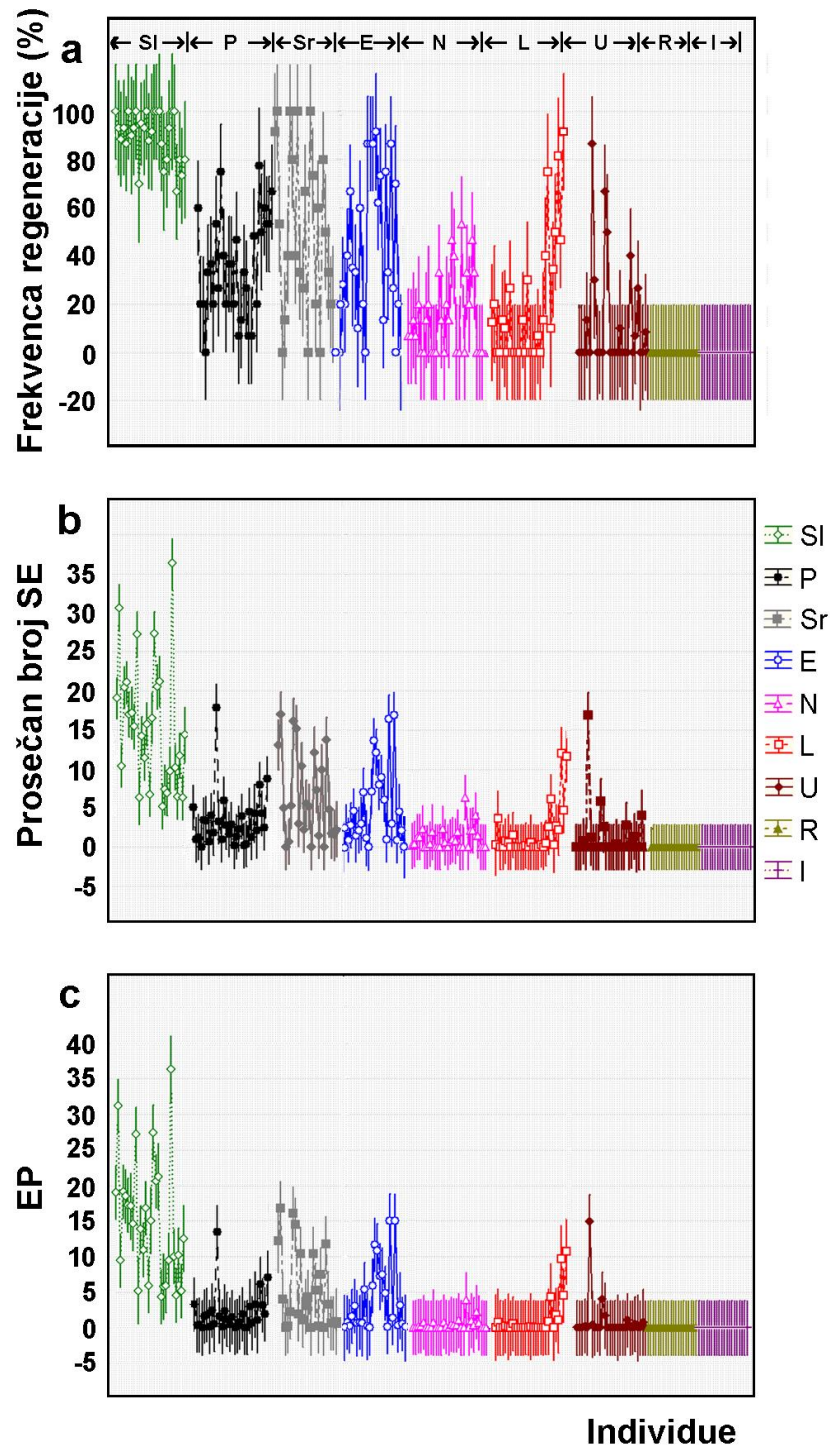
Varijabilnost	SS	df	MS	F	p	Partial η^2
Frekvencija regeneracije						
<i>Intercept</i>	143.5406	1	143.5406	2041.850	0.00	0.824374
Populacija	109.8631	8	13.7329	195.349	0.00	0.782260
Individue	66.4884	225	0.2955	4.204	0.00	0.684963
Standardna greška	30.5802	435	0.0703			
Prosečan broj SE						
<i>Intercept</i>	3130.625	1	3130.625	2629.858	0.00	0.457139
Populacija	3706.639	8	463.330	389.217	0.00	0.499257
Individue	2241.246	225	9.961	8.368	0.00	0.376116
Standardna greška	3717.670	3123	1.190			
EP						
<i>Intercept</i>	6555.16	1	6555.165	591.1402	0.00	0.576081
Populacija	13214.42	8	1651.802	148.9584	0.00	0.732582
Individue	10660.64	225	47.381	4.2728	0.00	0.688478
Standardna greška	4823.72	435	11.089			

SS - *Sum of squares*, df - *degrees of freedom*, MS - *Mean Square*, η^2 - *Eta-squared*. Modifikovano prema Belić *et al.* (2020a).

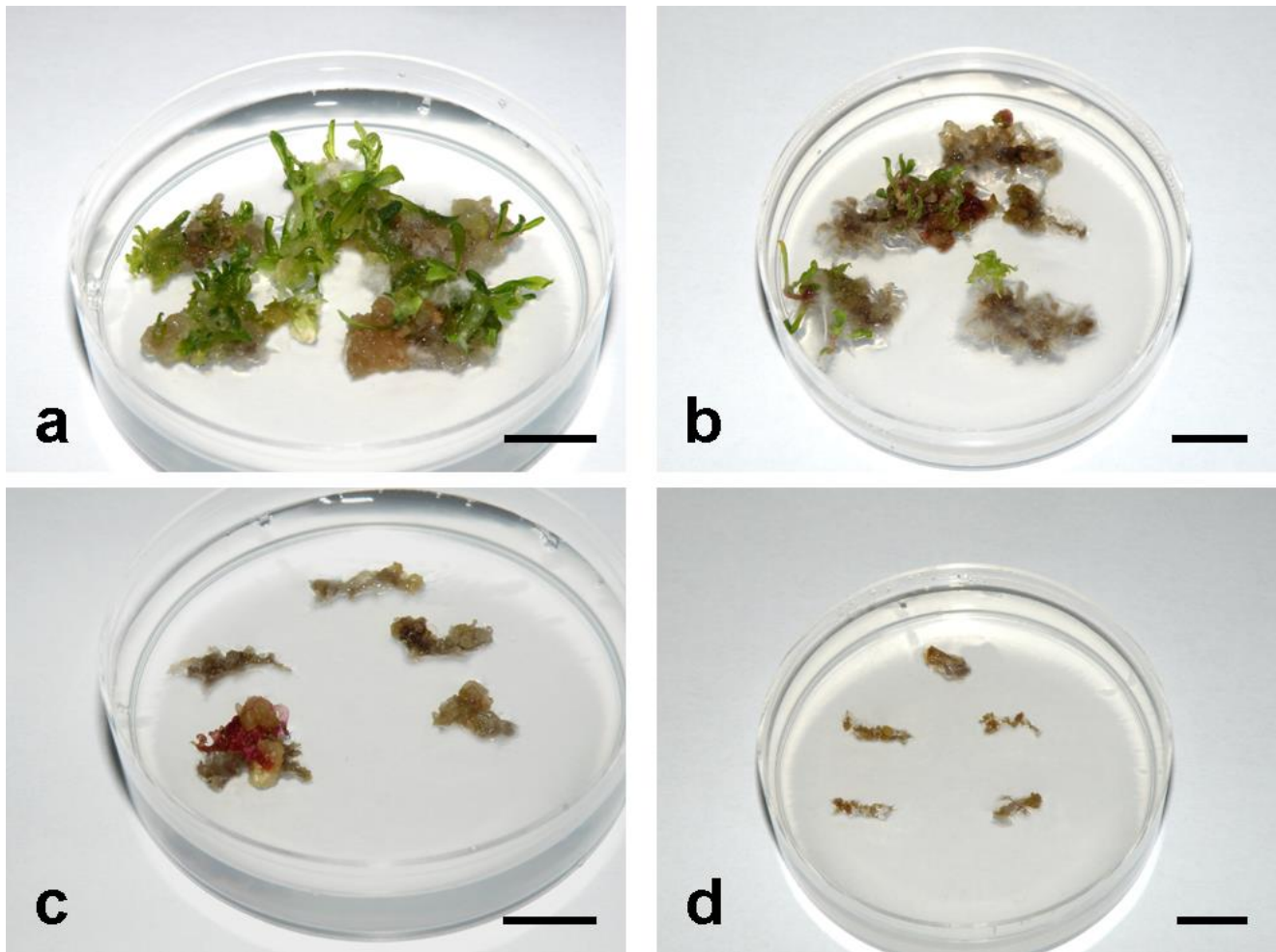
Razlike u embriogenom potencijalu na nivou populacije

Najveća frekvencija regeneracije SE i najmanja varijabilnost ovog parametra je bila prisutna kod jedinki S1 populacije (Sl. 5a, Sl. 6), dok je kod ostalih populacija zapažena njegoa velika varijabilnost, sa izuzetkom R i I populacija, čiji eksplantati nisu uopšte regenerisali SE (Sl. 5a) (Belić *et al.*, 2020a).

Međutim, za prosečan broj SE po eksplantatu i EP indeks uočena je manja varijabilnost, kako unutar tako i između populacija, osim za S1 populaciju, koja je pokazala najveće vrednosti, ali i najveću varijabilnost ovih promenljivih (Sl. 5b,c, Sl. 6) (Belić *et al.*, 2020a).



Slika 5. Embriogeni potencijal eksplantata izolovanih sa klijanaca sorte Matador poreklom iz 9 evropskih kompanija za proizvodnju semena, smeštenih u Sloveniji (SI), Poljskoj (P), Srbiji (Sr), Engleskoj (E), Nemačkoj (N), Litvaniji (L), Ukrajini (U), Rusiji (R) i Italiji (I). **(a)** Frekvencija regeneracije. **(b)** Prosečan broj SE po eksplantatu **(c)** EP indeks. Eksplantati su gajeni na IMSE tokom 12 nedelja. Vrednosti na grafiku predstavljaju srednje vrednosti po klijancu, dok vertikalni barovi označavaju interval poverenja (0.95). Modifikovano prema Belić *et al.* (2020a).

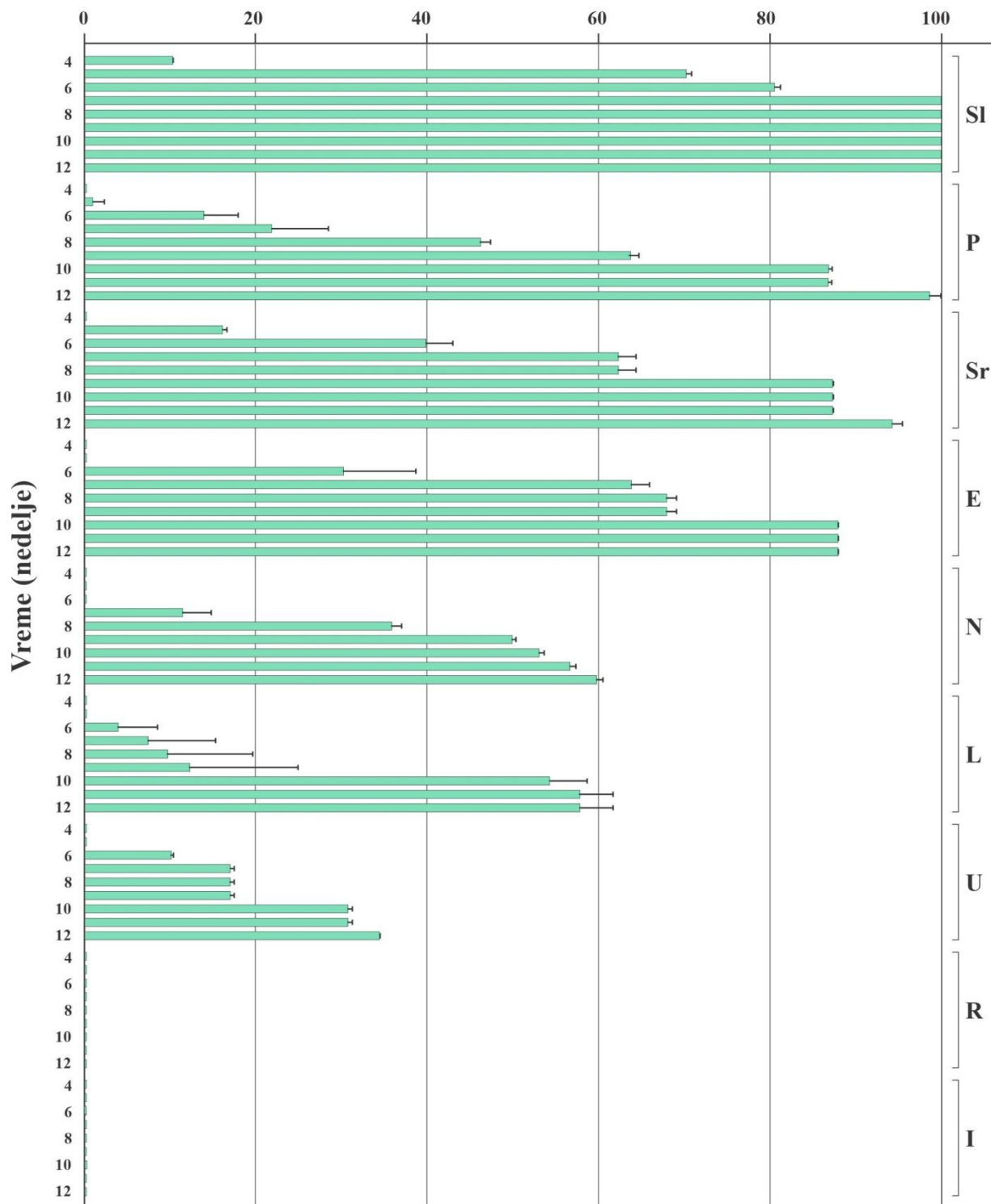


Slika 6. Razlike u embriogenom potencijalu eksplantata izolovanih sa klijanaca koji su dobijeni iz semena poreklom iz: (a) Sl, (b) P, (c) U i (d) R populacije, nakon 8 nedelja kultivacije na IMSE. Bar = 1 cm. Modifikovano prema Belić *et al.* (2020a)

Eksplantati Sl klijanaca su najbrže regenerisali SE. Kod 10,3% Sl klijanaca eksplantati su počeli regenerisati SE već u 4. nedelji kultivacije, da bi taj procenat porastao na 70% i 100% u 5. nedelji, odnosno 7. nedelji kultivacije (Sl. 7). Eksplantati klijanaca drugih populacija počeli su regenerisati SE znatno kasnije: P i Sr u 5. nedelji kultivacije, N, E, L i U u 6. nedelji kultivacije, dok eksplantati R i I populacije nisu regenerisali SE do kraja eksperimenta (Sl. 7). Prema tome, klijanci populacija koje su pokazale slabiji embriogeni potencijal su dostigli svoju najveću frekvenciju regeneracije znatno kasnije od Sl klijanaca, postigavši embriogeni odgovor kod 50% klijanaca u 6. (Sr), 7. (E), 9. (P i N) ili 10. (L) nedelji kultivacije (Sl. 7) (Belić *et al.*, 2020a).

Do kraja eksperimenta, eksplantati izolovani sa Sl klijanaca su pokazali najveću frekvenciju regeneracije (100%), zatim P (98%), Sr i E (88%, oba), N (60%), L (58%), U (34%), R i I (0%, oba) populacija (Sl. 6, 7) (Belić *et al.*, 2020a).

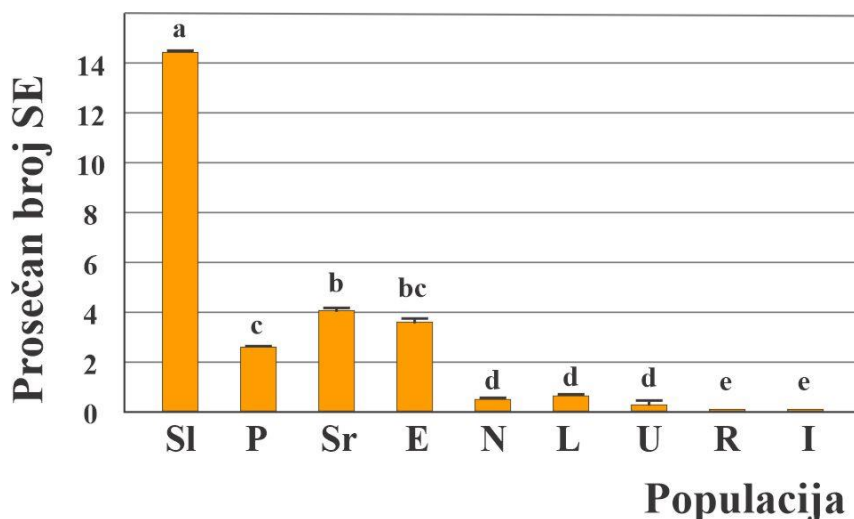
Frekvenca regeneracije



Slika 7. Frekvenca regeneracije eksplantata izolovanih sa klijanaca sorte Matador poreklom iz 9 evropskih kompanija za proizvodnju semena, smeštenih u Sloveniji (SI), Poljskoj (P), Srbiji (Sr), Engleskoj (E), Nemačkoj (N), Litvaniji (L), Ukrajini (U), Rusiji (R) i Italiji (I). Podaci na grafiku predstavljaju srednje vrednosti procenata \pm standardna greška klijanaca koji regenerišu SE u okviru populacije tokom 12 nedelja kultivacije na IMSE. Smatrano je da klijanac odgovara na induktivne uslove, ako je bar jedan ekplantat regenerisao SE. Modifikovano prema Belić *et al.* (2020a)

Kada je reč o prosečnom broju SE po eksplantatu, izračunatog za celu populaciju, populacije se mogu podeliti na četiri grupe: prvu grupu čini Sl populacija sa najvećim prosečnim brojem SE - 14.4 SE po eksplantatu, drugoj pripadaju P, Sr i E populacije sa 2,6-4,1 SE po eksplantatu, treća grupa uključuje N, L i U populacije sa samo 0,3-0,6 SE po eksplantatu i poslednju četvrtu grupu čine R i I populacije čiji eksplantati nisu regenerisali SE (Sl. 8) (Belić *et al.*, 2020a).

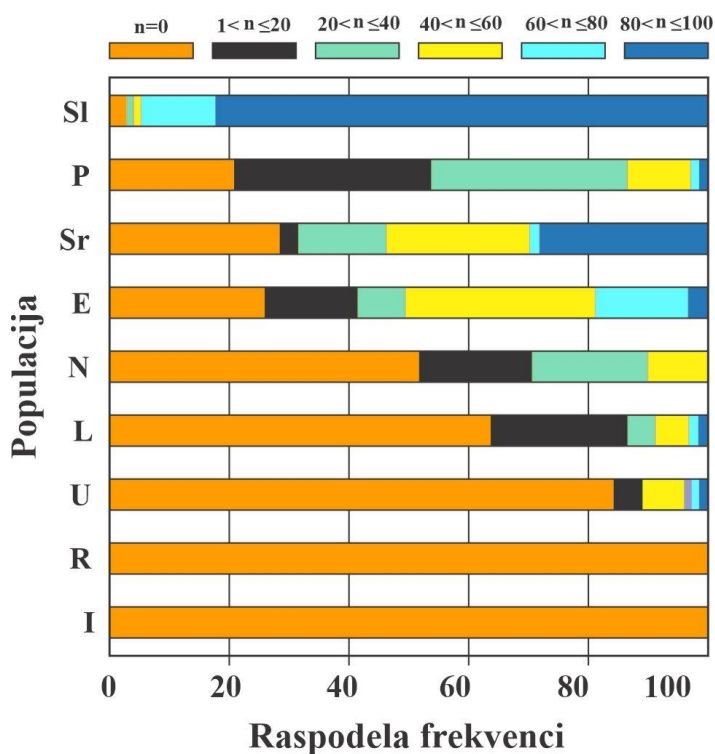
Prema tome, populacija koja se sastojala iz klijanaca sa većim embriogenim potencijalom dala je veći broj SE za znatno kraći vremenski period u poređenju sa populacijama koje su činile klijaneci sa slabijim embriogenim potencijalom.



Slika 8. Prosečan broj somatskih embriona (SE) po eksplantatu na nivou populacije. Semena spanaća sorte Matador su dobijena iz 9 evropskih kompanija za proizvodnju semena, smeštenih u Sloveniji (SI), Poljskoj (P), Srbiji (Sr), Engleskoj (E), Nemačkoj (N), Litvaniji (L), Ukrajini (U), Rusiji (R) i Italiji (I). Eksplantati korenova izolovani sa ovih klijanaca su kultivisani na IMSE tokom 12 nedelja. Vrednosti na grafiku predstavljaju srednje vrednosti broja SE \pm standardna greška. Vrednosti na grafiku označene istim slovom, nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu. Modifikovano prema Belić *et al.* (2020a)

Razlike u embriogenom potencijalu individua

Embriogeni potencijal individua u okviru populacija je procenjen na osnovu distribucije frekvenci regenerativnih eksplantata i prosečnog broja SE po eksplantatu. Raspodela frekvenci regeneracije eksplantata na nivou individua je pokazala da se SI populacija sastoji od klijanaca sa visokim embriogenim potencijalom. Unutar SI populacije, čak kod 82% klijanaca je 81-100% eksplantata regenerisalo SE, dok je u populacijama sa srednjim embriogenim potencijalom (Sr, P i E) kod najvećeg broja klijanaca (oko 40%) 21-60% eksplantata regenerisalo SE (Sl. 9). Kod populacija sa najslabijim embriogenim potencijalom (N, L i U), eksplantati 52-85% klijanaca nisu regenerisali SE, a eksplantati samo 1,3% klijanaca su regenerisali SE sa frekvencom regeneracije većom od 60%. Na kraju embriogeni odgovor je izostao kod klijanaca I i R populacije (Sl. 9) (Belić *et al.*, 2020a).

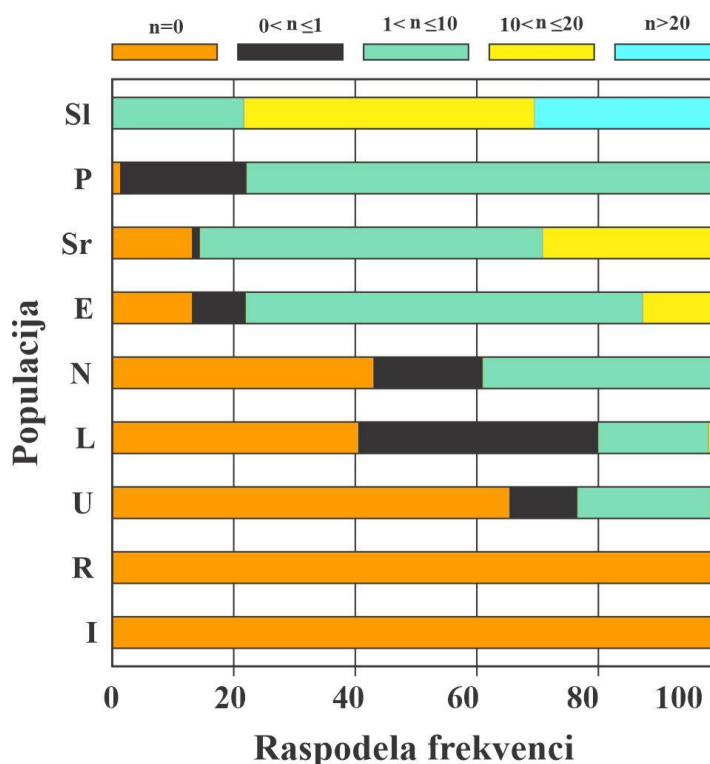


Slika 9. Distribucija frekvenci regeneracije kljjanaca sa različitim embriogenim potencijalom. Semena spanaća sorte Matador su dobijena iz 9 evropskih kompanija za proizvodnju semena, smeštenih u Sloveniji (SI), Poljskoj (P), Srbiji (Sr), Engleskoj (E), Nemačkoj (N), Litvaniji (L), Ukrajni (U), Rusiji (R) i Italiji (I). Eksplantati korenova izolovani sa ovih kljjanaca su kultivisani na IMSE tokom 12 nedelja. Frekvencija regeneracije SE iz eksplantata je određena za svaki kljjanac u okviru svake populacije, a zatim su ti podaci svrstani u sledeće klase: $n=0$, $1 < n \leq 20$, $20 < n \leq 40$, $40 < n \leq 60$, $60 < n \leq 80$ i $80 < n \leq 100$ %. Podaci predstavljaju procenat kljjanaca koji pripadaju svakoj od navedenih klasa u okviru svake populacije. Modifikovano prema Belić *et al.* (2020a)

Eksplantati SI kljjanaca regenerisali su i najveći broj SE: eksplantati 19,6% kljjanaca su regenerisali $1 < n \leq 10$ SE, dok su eksplantati 43,5% i 27,6% kljjanaca regenerisali $10 < n \leq 20$, odnosno $n > 20$ SE po eksplantatu (Sl. 10). U Sr populaciji, eksplantati 54,2% i 27,9% kljjanaca su regenerisali $1 < n \leq 10$, odnosno $10 < n \leq 20$ SE, dok su eksplantati većine kljjanaca iz P, E i N populacije (73,8%, 59,7%, odnosno 36,1%), regenerisali 1-10 SE (Sl. 10). Eksplantati samo 1% kljjanaca P, E i U populacije su regenerisali $10 < n \leq 20$ SE po eksplantatu, dok u N i L populacijama nije bilo kljjanaca čiji su eksplantati regenerisali ovaj broj SE (Sl. 10) (Belić *et al.*, 2020a).

S obzirom da su SI kljjaneci pokazali najveći embriogeni potencijal u ovom eksperimentu, samo su kljjaneci ove populacije korišćeni u svim ostalim eksperimentima. Iz SE dobijenih u ovom eksperimentu, koji su kultivisani na medijumu sa $5 \mu\text{M}$ Kin, su se razvile kompletne biljke. Svi SE koji su regenerisali iz eksplantata jednog kljjanca su održavani kao jedna linija. Linija SI122, koja je pokazala značajan embriogeni potencijal, je održavana procesom ciklične somatske embriogeneze, a apikalni odsecci korenova izolovani sa biljaka ove linije su takođe korišćeni za neke eksperimente.

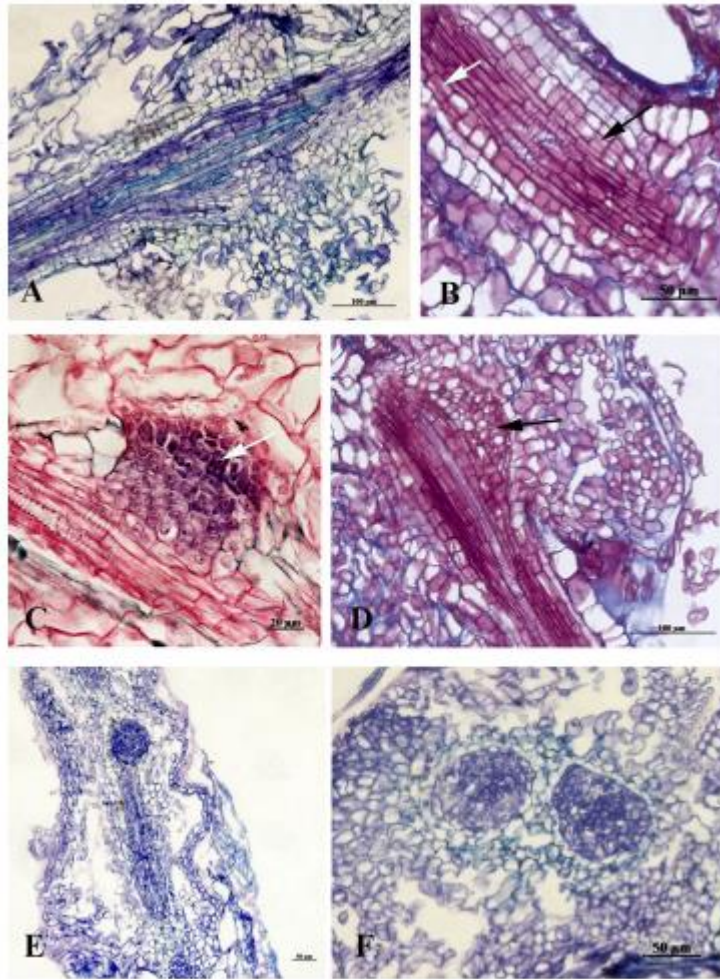
Imajući u vidu visoku varijabilnost embriogenog potencijala individua u okviru populacije, testiran je metod za uzorkovanje biljnog materijala, kako bi se anulirao uticaj genetičkog i svih drugih faktora koji su tokom formiranja semena mogli uticati na embriogeni potencijal kljjanca i omogućilo proučavanje uticaja svetlosti i giberelina na ovaj proces.



Slika 10. Frekvencija raspodele prosečnog broja SE po eksplantatu. Semena spanaća sorte Matador su dobijena iz 9 evropskih kompanija za proizvodnju semena, smeštenih u Sloveniji (SI), Poljskoj (P), Srbiji (Sr), Engleskoj (E), Nemačkoj (N), Litvaniji (L), Ukrajni (U), Rusiji (R) i Italiji (I). Eksplantati korenova izolovani sa ovih klijanaca su kultivisani na IMSE tokom 12 nedelja. Prosečan broj SE po eksplantatu je izračunat za svaki klijanac, a podaci su svrstani u odgovarajuću klasu: $n = 0$, $0 < n \leq 1$, $1 < n \leq 10$, $10 < n \leq 20$, i $n > 20$. Podaci predstavljaju procenat klijanaca koji pripadaju svakoj od navedenih klasa u okviru populacije. Modifikovano prema Belić *et al.* (2020a)

4.1.2. Histološka analiza

Histološka analiza je urađena u svrhu ispitivanja iz kojih tkiva i ćelija korena regenerišu SE. U eksplantatima gajenim na IMSE u uslovima DD, histološke promene su detektovane u vaskularnom tkivu i okolnom parenhimu (Sl. 11a, b) (Belić *et al.*, 2020b). Prvi događaji koji su doveli do formiranja SE su bile perikline i antikline deobe ćelija u tkivu pericikla i parenhima koji okružuju vaskularne elemente (Sl. 11b). Nakon početnih deoba ćelija, usledila je proliferacija ćelija koja je rezultirala uspostavljanjem zone proliferacije koja se sastajala iz nekoliko ćelijskih slojeva. Uočene su male meristemske ćelije sa gustom citoplazmom i velikim jedrima koje su bile okružene velikim vakuolizovanim neembrionalnim ćelijama (Sl. 11c). Intezivne ćelijske deobe dovele su do narušavanja uređenih slojeva i formiranja u proembrionalnog tkiva (Sl. 11d) (Belić *et al.*, 2020b). Prelazak proembrionalnog u globularni stadijum razvića SE je karakterisalo formiranje meristemskih centara sa intenzivnom mitotskom aktivnošću. Proembrionalno tkivo se diferenciralo u SE sa tipičnim meristemskim ćelijama (Sl. 11e, f). Prema tome, dobijeni SE potiču iz ćelija pericikla i parenhima koji su povezani sa vaskularnim tkivom.



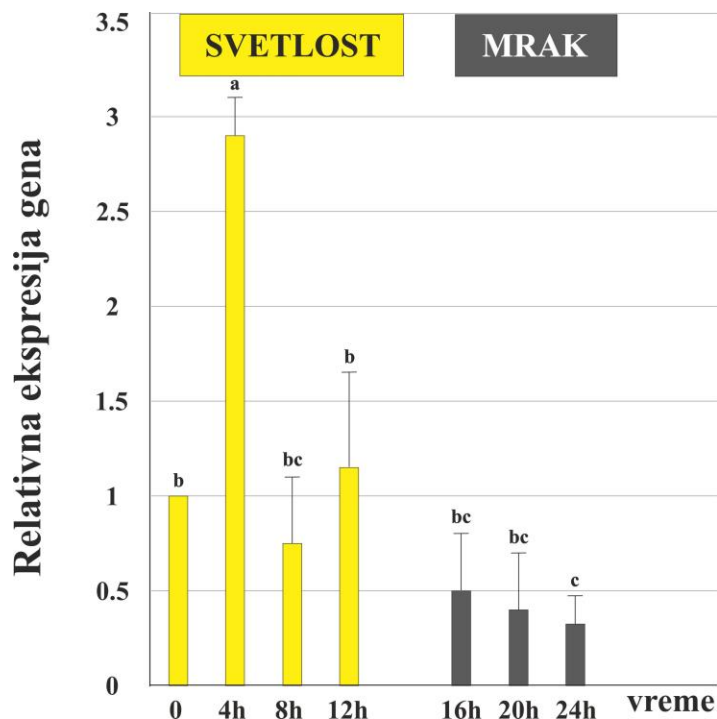
Slika 11. Histološka analiza apiklanih odsečaka korenova spanaća gajenih na IMSE u uslovima DD tokom 4 nedelje. **a)** Poprečni presek eksplantata. **b)** Perikline deobe ćelija u periciklu korena (označene strelicama). **c)** Proliferacija ćelija u okolini vaskularnog tkiva. Uočljive male meristemske ćelije sa gustom citoplazmom i velikim jedrom (označeno strelicama). **d)** Proembrionalna zona koja se sastoji od grupe mitotski aktivnih ćelija (označeno strelicama). **e)** Presek eksplantata koji pokazuje razviće SE iz vaskularnog tkiva. **f)** Globularni SE na periferiji eksplantata. Modifikovano prema Belić *et al.* (2020b)

4.1.3. Ispitivanje metode uzorkovanja biljnog materijala praćenjem ekspresije *SoRIP2* gena

Za ispitivanje metode uzorkovanja biljnog materijala korišćene su dve metode kvantifikacije embriogenog potencijala: 1) klasična kvantifikacija SE pomoću stereomikroskopa i 2) kvantifikacija ekspresije gena *SoRIP2*, kao markera za rane stadijume SE.

S obzirom da protein *SoRIP2* ima odbrambenu funkciju, koja najčešće podrazumeva diurnalno variranje ekspresije gena koji ga kodira, najpre je praćeno diurnalno variranje ekspresije *SoRIP2* gena u eksplantatima kultivisanim na IMSE, kako bi se utvrdilo najpogodnije vreme uzorkovanja biljnog materijala. Ekspresija *SoRIP2* gena je analizirana u 6 vremenskih tačaka tokom 24h. Najveći povećanje ekspresije *SoRIP2* gena je detektovano u eksplantatima koji su uzorkovani 4h nakon izlaganja svetlosti i to povećanje je bilo 3 puta veće u poređenju sa eksplantatima koji su uzorkovani u vremenskoj tački 0

(trenutak početka izlaganja eksplantata svetlosti) (Sl. 12, Milić *et al.*, 2017). Na osnovu toga, svi eksplantati u daljim eksperimentima su uzorkovani u isto vreme tj. 4h nakon uključivanja svetla.

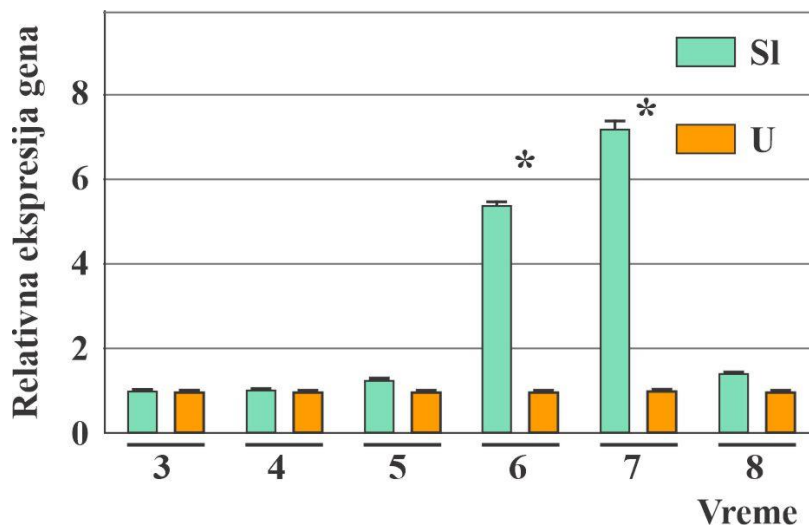


Slika 12. Diurnalno variranje ekspresije *SoRIP2* gena u apikalnim odsečcima korenova gajenim na IMSE tokom 4 nedelje. Posle isteka tog vremena, eksplantati su uzorkovani u sledećim vremenskim tačkama tokom dana: u trenutku uključivanja svetla (vremenska tačka 0) i nakon 4, 8, 12, 16 i 24h, tj. neposredno pre uključivanja svetla. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su uzorkovani u vremenskoj tački 0, kojoj je dodeljena vrednost 1. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin upotrebom $\Delta\Delta C_t$ metoda. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu. Modifikovano prema Milić *et al.* (2017).

Metoda uzorkovanja biljnog materijala je testirana na eksplantatima iz S1 i U populacije, koji su pokazali najveći i najniži embriogeni potencijal u prethodnom eksperimentu. Eksplantati su upoređivani u šest vremenskih tačaka tokom perioda indukcije SE određivanjem ekspresije *SoRIP2* gena za procenu nivoa embriogenog odgovora.

U eksplantatima poreklom iz S1 populacije, ekspresija *SoRIP2* se značajno povećala u 6. nedelji u odnosu na kontrolu, dostižući 7.4 puta veću ekspresiju u 7. nedelji kultivacije na IMSE, nakon čega se ekspresija ovog gena smanjila do nivoa kontrole (Sl. 13). Međutim, u eksplantatima poreklom iz U populacije nije bilo značajne razlike u ekspresiji *SoRIP2* gena tokom čitavog perioda kultivacije na IMSE (Sl. 13) (Belić *et al.*, 2020a).

U kontrolnim eksplantatima, koji su paralelno postavljeni za klasičnu kvantifikaciju korišćenjem genetički identičnog biljnog materijala, prvi SE na eksplantatima poreklom iz S1 populacije su uočeni pomoću binokulara u 7. nedelji kultivacije. Frekvenca regeneracije eksplantata iz S1 populacije je iznosila $80\% \pm 0$, dok je prosečan broj SE po eksplantatu bio $7.3 \pm 1,0$ (Belić *et al.*, 2020a). Nijedan eksplantat poreklom iz U populacije nije regenerisao SE tokom 12 nedelja kultivacije na IMSE.



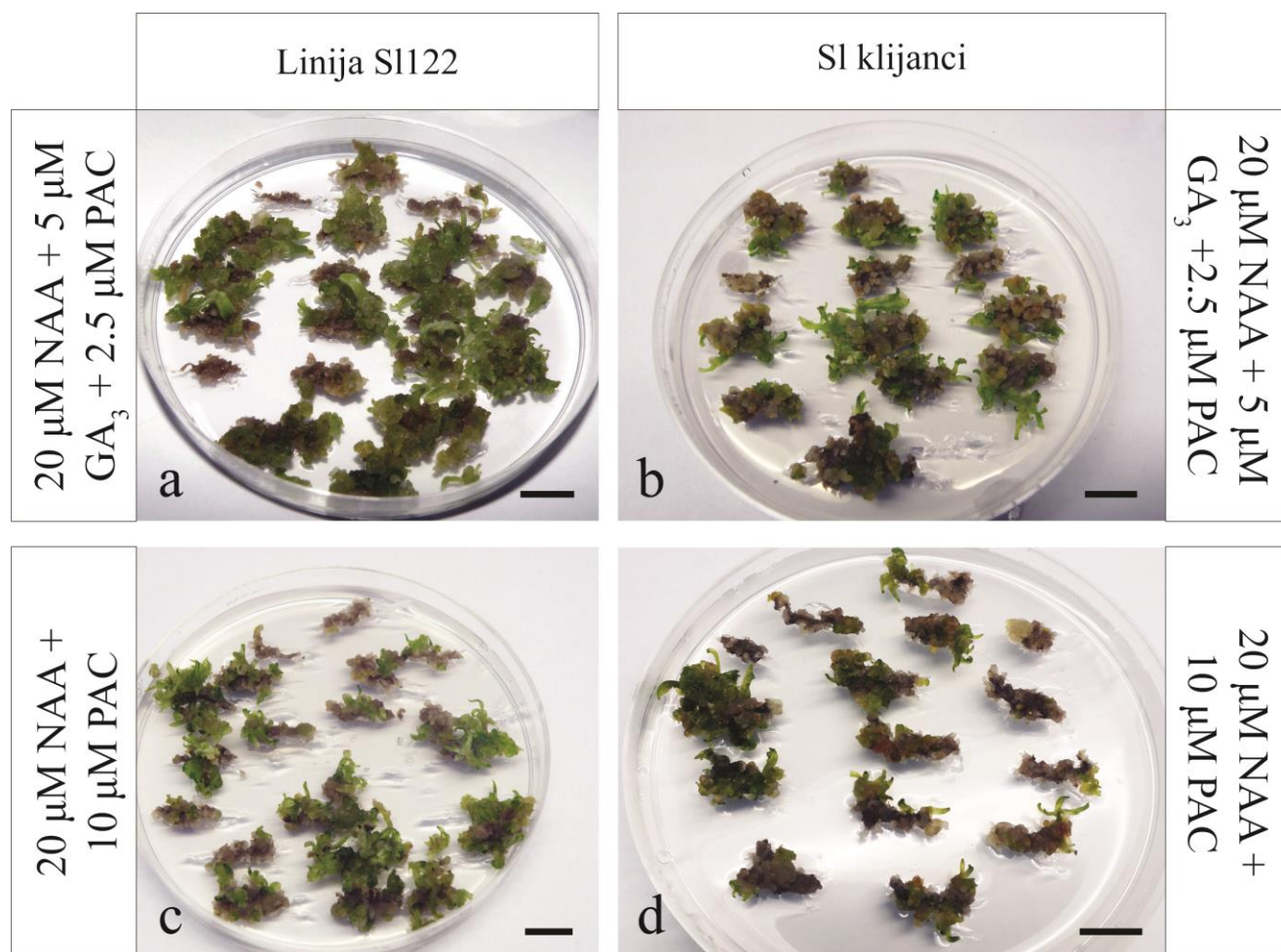
Slika 13. Ekspresija *SoRIP2* gena u apikalnim odsečcima korenova izolovanih sa Sl i U klijanaca kultivisanih na IMSE u period od 3-8 nedelja. Kao kalibrator su korišćeni apikalni odsecci korenova gajeni na IMSE tokom 3 nedelje, kojima je dodeljena vrednost 1. Ekspresija *SoRIP2* je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin upotrebom $\Delta\Delta C_t$ metoda. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti koje su označene zvezdicom su statistički značajno različite od kalibratora prema t-testu za zavisne uzorke. Modifikovano prema Belić *et al.* (2020a)

S obzirom da su obe metode kvantifikacije pokazale da je ovaj način uzorkovanja pouzdan, i pored velike individualne varijabilnosti biljnog materijala, ona je korišćena u svim narednim eksperimentima. Pošto je regenerativni potencijal eksplantata Sl klijanaca bio znatno niži u ovom eksperimentu u odnosu na prethodni eksperiment, u svim narednim eksperimentima je kao kontrola testiran regenerativni potencijal konkretne grupe klijanaca kultivacijom genetički identičnog materijala na IMSE tokom 12 nedelja i klasičnom kvantifikacijom embriogenog potencijala.

4.1.4. Inhibitori biosinteze giberelina

U cilju proučavanja mehanizma kojim GA_3 utiče na indukciju somatske embriogeneze iz eksplantata, testirano je kako prisustvo PAC u IMSE (NAA+ GA_3) ili u medijumu koji sadrži NAA kao jedini BRR utiče na embriogeni potencijal eksplantata. Eksplantati Sl klijanaca i linije Sl122 kultivisani na medijumu sa varijabilnim koncentracijama PAC su uvek regenerisali SE, ali su ispoljavali različit embriogeni potencijal, koji je uvek bio veći kod eksplantata linije Sl122, što je očekivano s obzirom da je ova linija izabrana u prethodnom eksperimentu kao linija sa visokim embriogenim potencijalom (Sl. 14-16).

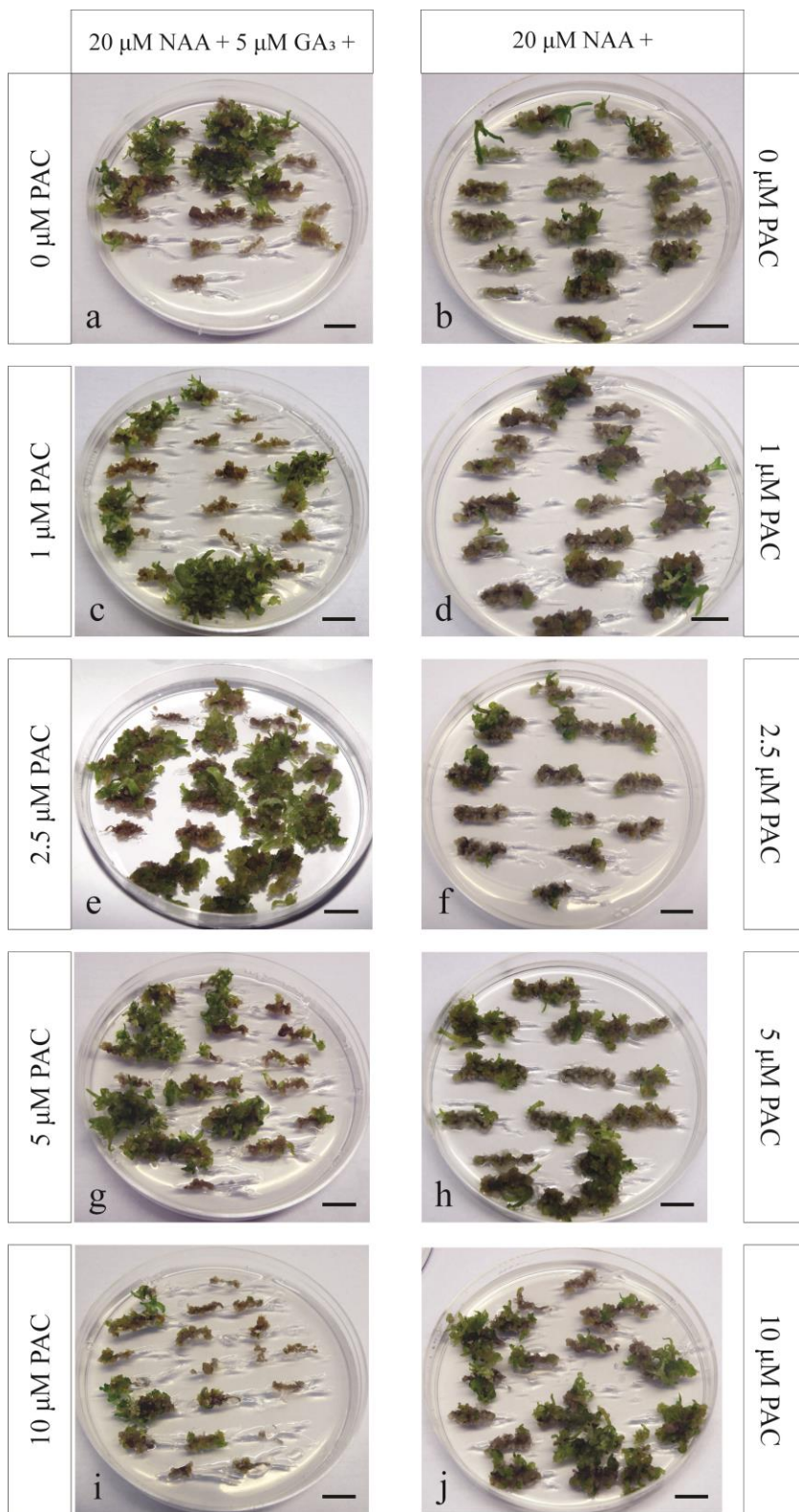
Dodavanje PAC u IMSE je statistički značajno uticalo na frekvencu regeneracije eksplantata Sl klijanaca ($p \leq 0.002$), ali nije uticalo na frekvencu regeneracije eksplantata linije Sl122. U odsustvu PAC, eksplantati linije Sl122 su regenerisali sa većom učestalošću ($99.40\% \pm 0.59$) od eksplantata izolovanih sa nasumično izabranih Sl klijanaca ($81.49\% \pm 1.78$) (Sl.16a). Dodatak PAC u IMSE je izazvao povećanje frekvence regeneracije eksplantata izolovanih sa Sl klijanaca, koja je kod eksplantata kultivisanih na medijumu sa $2.5 \mu M$ PAC bila statistički značajno veća ($99.78\% \pm 0.21$) nego frekvencu regeneracije eksplantata kultivisanih u odsustvu PAC ($81.49\% \pm 1.78$) i dostigla je frekvencu regeneracije eksplantata izolovanih sa biljaka linije Sl122 (100%) (Sl. 16a).



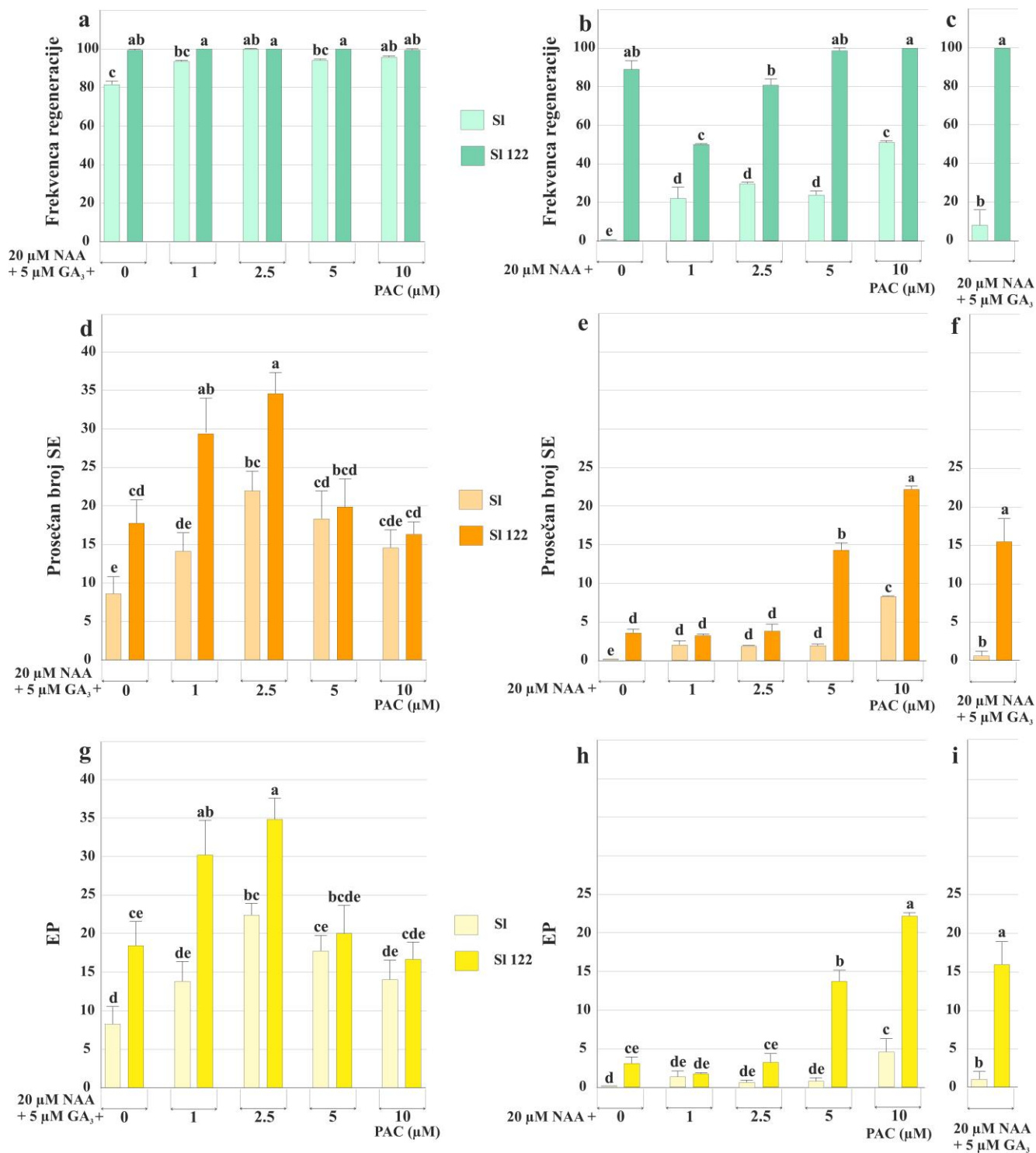
Slika 14. Uticaj PAC na embriogeni potencijal apikalnih odsečaka korenova linije SI122 (**a, c**) i SI klijanaca (**b, d**). Eksplantati su gajeni na IMSE (20 μM NAA + 5 μM GA₃) uz dodatak 2.5 μM PAC (**a, b**) ili na medijumu koji je sadržao 20 μM NAA uz dodatak 10 μM PAC (**c, d**) tokom 12 nedelja.

Na medijumu koji je sadržao NAA kao jedini BRR, eksplantati izolovani sa SI klijanaca nisu regenerisali SE, dok su eksplantati linije SI122 regenerisali SE sa frekvencom $89.03\% \pm 4.47$ (Sl. 16b). Dodatak 1 μM PAC u ovaj medijum je izazvao smanjenje frekvence regeneracije kod eksplantata SI122, da bi zatim pri koncentraciji 5 i 10 μM PAC frekvencija regeneracije SI122 eksplantata bila značajno veća (100%) nego kod eksplantata kultivisanih na medijumu sa 1 μM PAC (Sl. 16b), dostigavši frekvencu regeneracije eksplantata koji su bili kultivisani na medijumu bez PAC (Sl. 16d), čak i kontrolnih eksplantata kultivisanih na IMSE (Sl. 16c).

Za razliku od eksplantata linije SI122, frekvencija regeneracije eksplantata izolovanih sa SI klijanaca kultivisanih na medijumu sa NAA + PAC je bila značajno veća u odnosu na frekvencu regeneracije eksplantata kultivisanih na medijumu bez PAC, sa najvećom vrednošću pri 10 μM PAC ($50.93\% \pm 0.89$). Ta vrednost je bila veća čak i od frekvence regeneracije koju su pokazali eksplantati ove grupe SI klijanaca kultivisani na IMSE ($8.07\% \pm 8.07$) (Sl. 16c).



Slika 15. Uticaj PAC na embriogeni potencijal apikalnih odsečaka korenova spanaća. Eksplantati su gajeni na IMSE (20 μM NAA + 5 μM GA₃) uz dodatak 0-10 μM PAC (a, c, e, g, i) ili na medijumu koji je sadržao 20 μM NAA uz dodatak 0-10 μM PAC (b, d, f, h, j) tokom 12 nedelja.



Slika 16. Uticaj PAC na embriogeni potencijal apikalnih odsečaka korenova spanača. Eksplantati su gajeni na IMSE (20 μM NAA + 5 μM GA₃) uz dodatak 0-10 μM PAC (**a, d, g**) ili na medijumu koji je sadržao 20 μM NAA uz dodatak 0-10 μM PAC (**b, e, h**) tokom 12 nedelja. Za testiranje punog embriogenog potencijala grupe klijanaca kultivisanih na 20 μM NAA + 0-10 μM PAC, postavljena je kontrola genetički identičnog materijala kultivisanog na IMSE bez PAC (**c, f, i**). (**a, b, c**) Frekvencija regeneracije. (**d, e, f**) Prosečan broj SE. (**g, h, i**) EP indeks. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška. Za svaki tretman su postavljene tri petri kutije sa po 10-15 eksplantata (n=30-45). Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite (p<0.05) prema LSD testu.

Koncentracija PAC u medijumu koji je sadržao 20 μM NAA je statistički značajno uticala na prosečan broj SE po eksplantatu ($p \leq 0.001$) i EP indeks ($p \leq 0.00007$) kada je u medijumu bio dodat i GA_3 (IMSE). U slučaju kada u medijumu nije bio prisutan GA_3 , koncentracija PAC je sa još većom statističkom značajnošću uticala na prosečan broj SE po eksplantatu ($p \leq 0.0000001$) i EP indeks ($p \leq 0.0000001$).

Eksplantati linije S1122 kultivisani na IMSE bez PAC su regenerisali značajno veći prosečan broj SE po eksplantatu u odnosu na eksplantate S1 klijanca (17.74 ± 2.95 , odnosno $8,58 \pm 2.23$) (Sl. 16d). Dodatak 1-2.5 μM PAC u IMSE je izazvao statistički značajno povećanje broja SE po eksplantatu linije S1122, da bi taj broj zatim bio niži i približan kontroli pri 5-10 μM PAC (Sl. 16d). Za razliku od linije S1122, za povećanje broja SE po eksplantatu S1 klijanaca je bila potrebna veća koncentracija PAC, koja se kretala u opsegu 2.5-5 μM . I kod eksplantata S1 klijanaca prosečan broj SE po eksplantatu je bio statistički značajno niži pri 10 μM PAC (Sl. 16d). Dakle, najveći prosečan broj SE po eksplantatu i S1 klijanaca (21.95 ± 2.5) i linije S1122 (34.57 ± 2.72) je postignut kod eksplantata kultivisanih na IMSE + 2.5 μM PAC (Sl. 16d).

Kao što je već rečeno, S1 eksplantati kultivisani na medijumu sa 20 μM NAA bez PAC nisu regenerisali, dok su eksplantati linije S1122 regenerisali prosečno 3.55 ± 0.46 SE po eksplantatu (Sl. 16e). Do porasta broja SE kod S1122 eksplantata je došlo tek kad je u medijumu sa 20 μM NAA dodat 5 μM PAC, a najveći prosečan broj SE po eksplantatu ove linije je dobijen kod eksplantata kultivisanih na medijumu sa 10 μM PAC + 20 μM NAA (22.19 ± 0.42 , Sl. 12e). Za razliku od eksplantata linije S1122, kod S1 eksplantata je došlo do statistički značajnog porasta broja SE već pri 1 μM PAC, a najveći broj SE su regenerisali eksplantati kultivisani na medijumu sa 10 μM PAC (8.25 ± 0.07 , Sl. 12e), što je značajno veće i od broja SE kod S1 eksplantata kultivisanih na IMSE (0.57 ± 0.57 , Sl. 16f).

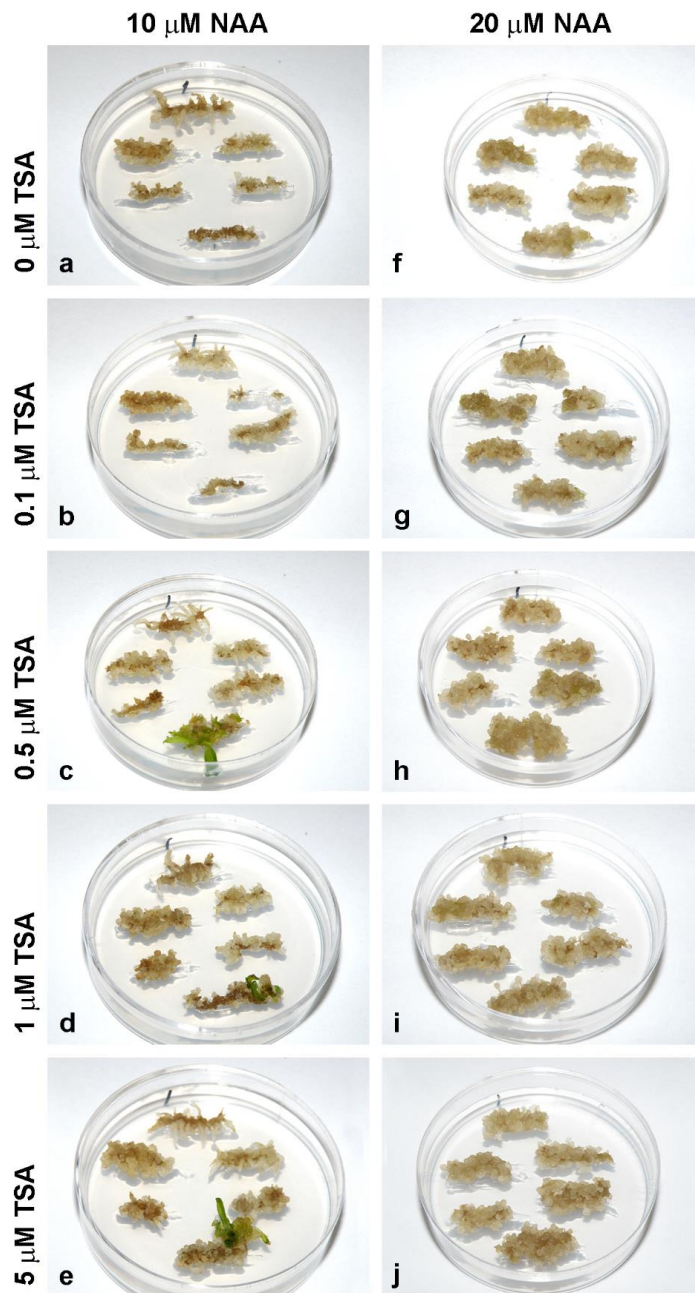
Zanimljivo je da je kod eksplantata linije S1122 kultivisanih na medijumu sa 20 μM NAA + 5 μM PAC, koja je ekvimolarna koncentraciji GA_3 u IMSE, dobijen prosečan broj SE (14.3 ± 0.91) približan prosečnom broju SE (15.4 ± 3.01) kod eksplantata ove linije kultivisanih na IMSE (Sl. 16e, f). Kao što je i očekivano, najveće vrednosti EP indeksa su imali eksplantati izolovani sa S1 klijanaca (21.90 ± 1.5) i linije S1122 (34.57 ± 2.72) kultivisani na IMSE + 2.5 μM PAC (Sl. 16g), dok su u odsustvu GA_3 najveće vrednosti EP indeksa od 4.54 ± 1.71 za S1 klijance i 22.19 ± 0.41 za liniju S1122 imali eksplantati kultivisani na medijumu sa 10 μM PAC + 20 μM NAA (Sl. 16h).

4.1.5. Trihostatin

Eksplantati kultivisani na medijumu bez BRR ili na medijumu sa 1 μM NAA ili 5 μM GA_3 nisu regenerisali SE ni u prisustvu ni u odsustvu TSA, što ukazuje da 0.1-5 μM TSA sam po sebi nije bio dovoljan za indukciju somatske embriogeneze iz odsečaka korenova spanaća i nije mogao u potpunosti da zameni ni NAA ni GA_3 . Za razliku od navedenih, eksplantati kultivisani na medijumu sa 10 μM NAA + TSA su samo sporadično regenerisali SE (Sl. 17a-e), dok eksplantati kultivisani na medijumu sa 20 μM NAA + TSA nisu regenerisali SE tokom 12 nedelja (Sl. 17f-j).

Eksplantati kultivisani na medijumu sa 10 μM NAA su regenerisali SE sa frekvencom od najviše $6.24 \pm 1.06\%$ i prosečno 0.16 ± 0.05 SE po eksplantatu (Tabela 11). Iako prisustvo TSA u medijumu, u smislu koncentracije i dužine trajanja TSA tretmana, nije statistički značajno uticalo na embriogeni potencijal eksplantata, eksplantati kultivisani na medijumu sa 10 μM NAA + TSA su regenerisali sa većom frekvencom i prosečnim brojem SE po eksplantatu u odnosu na eksplantate kultivisane na medijumu bez TSA (Tabela 11).

Kontrolni eksplantati kultivisani na medijumu sa $10 \mu\text{M}$ NAA, bez DMSO i TSA nisu regenerisali SE, a t test je pokazao odsustvo statističke značajnosti između kontrolne grupe eksplantata kultivisanih na medijumu bez DMSO i svih eksplantata kultivisanim na ostalim tretmanima za frekvencu regeneracije, broj SE po eksplantatu i EP indeks.



Slika 17. Uticaj koncentracije trihostatina (TSA) u kombinaciji sa **a-e)** $10 \mu\text{M}$ NAA ili **f-j)** $20 \mu\text{M}$ NAA na indukciju regeneracije somatskih embriona iz apikalnih odsečaka korenova spanaća. TSA je primenjen u koncentraciji: **a, f)** $0 \mu\text{M}$, **b, g)** $0.1 \mu\text{M}$, **c, h)** $0.5 \mu\text{M}$, **d, i)** $1 \mu\text{M}$ ili **e, j)** $5 \mu\text{M}$, a tretman je trajao 1 dan, posle čega su eksplantati kultivisani na medijumu bez TSA. TSA je rastvoren u DMSO, koji je u sve medijume dodat u koncentraciji 0.05%. Na sve tretmane je postavljen genetički identičan materijal (jedan koren po tretmanu sa svakog klijanca). Objekti su snimljeni posle 8 nedelja kultivacije.

Tabela 11. Uticaj trihostatina (TSA) na regeneraciju somatskih embriona iz apikalnih odsečaka lateralnih korenova spanača. Eksplantati su kultivisani na medijumu sa 10 μM NAA + 0, 0.1, 0.5, 1 ili 5 μM TSA tokom 1, 7 ili 14 dana, a zatim su subkultivisani na medijum sa 10 μM NAA bez TSA. TSA je rastvoren u DMSO. Jedna kontrolna grupa eksplantata je kultivisana na medijumu sa DMSO bez TSA, a druga na medijumu bez DMSO i TSA. Medijumi sa DMSO su sadržali 0.05% DMSO. SE su kvantifikovani posle 8 i 12 nedelja. Za svaki tretman je postavljeno 5 petri kutija sa po 6 eksplantata (n=30). Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška. Za sve tretmane i kontrolu je korišćen genetički jednak uzorak. Rezultati ANOVA su prikazani za nezavisne variable i njihovu interakciju.

Dužina tretmana (dan)	TSA (μM)	8 nedelja			12 nedelja		
		Frekvencija regeneracije (%)	Broj SE	EP	Frekvencija regeneracije (%)	Brj SE	EP
‡Kontrola bez DMSO	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0.71 \pm 0.71	0.004 \pm 0.004	0.022 \pm 0.022
	0.1	0	0	0	0.71 \pm 0.71	0.018 \pm 0.018	0.089 \pm 0.089
	0.5	0.71 \pm 0.71	0.012 \pm 0.012	0.061 \pm 0.061	5.93 \pm 2.25	0.164 \pm 0.046	0.499 \pm 0.387
	1	0.71 \pm 0.71	0.004 \pm 0.004	0.022 \pm 0.022	2.81 \pm 1.06	0.042 \pm 0.020	0.106 \pm 0.065
	5	0.71 \pm 0.71	0.005 \pm 0.005	0.028 \pm 0.028	2.81 \pm 1.06	0.044 \pm 0.021	0.111 \pm 0.070
7	0	0.71 \pm 0.71	0.009 \pm 0.009	0.044 \pm 0.044	0.71 \pm 0.71	0.021 \pm 0.021	0.106 \pm 0.106
	0.1	0	0	0	0.71 \pm 0.71	0.015 \pm 0.015	0.078 \pm 0.078
	0.5	2.81 \pm 1.06	0.010 \pm 0.005	0.028 \pm 0.022	4.23 \pm 1.69	0.103 \pm 0.034	0.244 \pm 0.165
	1	0	0	0	6.24 \pm 1.06	0.074 \pm 0.024	0.189 \pm 0.083
	5	0	0	0	6.24 \pm 1.06	0.055 \pm 0.019	0.161 \pm 0.097
14	0	0	0	0	2.81 \pm 1.06	0.026 \pm 0.013	0.067 \pm 0.044
	0.1	0	0	0	2.81 \pm 1.06	0.020 \pm 0.009	0.050 \pm 0.031
	0.5	0	0	0	2.81 \pm 1.06	0.010 \pm 0.005	0.028 \pm 0.022
	1	0.71 \pm 0.71	0.004 \pm 0.004	0.022 \pm 0.022	6.24 \pm 1.06	0.027 \pm 0.009	0.050 \pm 0.027
	5	0	0	0	2.81 \pm 1.06	0.019 \pm 0.010	0.050 \pm 0.033
Dužina tretmana (A)		NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Koncentracija TSA (B)		NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
AxB		NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ - nema statističke značajnosti između tretmana. ‡ Kontrolni medijum je sačinjavao 10 μM NAA bez DMSO i TSA.

Druga grupa kontrolnih eksplantata, kultivisanih na IMSE, je korišćena za procenu embriogenog potencijala konkretne grupe klijanaca koji su korišćeni za eksperiment, kao i za poređenje rezultata različitih eksperimenata. Posmatrajući kontrolne eksplantate kultivisane na IMSE, eksplantati kultivisani na medijumu sa 10 μM NAA + TSA su imali približan embriogeni potencijal eksplantatima kultivisanim na medijumu sa 20 μM NAA + TSA (EP indeks 5.81 ± 0.62 , odnosno 6.65 ± 1.29).

Kao što se može videti na Sl. 17, eksplantati kultivisani na medijumu sa 10 μM NAA su formirali kratke lateralne korenove, koji su kalusirali, dok su eksplantati kultivisani na medijumu sa 20 μM NAA obilnije proliferirali i formirali kalus sa malim brojem kratkih lateralnih korenova.

Kombinacije NAA+GA₃+TSA su izazvale efikasniju indukciju somatske embriogeneze. Za razliku od prethodnih, eksplantati kultivisani na medijumu sa 1 μM NAA + 5 μM GA₃ su se značajno izdužili i formirali veliki broj lateralnih korenova u prisustvu 0-1 μM TSA, dok su se u prisustvu 5 μM TSA eksplantati samo neznatno izdužili i u oblasti apikalnog meristema korena formirali žuto-zelena zadebljanja. SE su regenerisali iz apikalnog regiona korenova (Sl. 18).



Slika 18. Regeneracija somatskih embriona iz apikalnih odsečaka korenova spanaća kultivisanih na medijumu sa 1 μM NAA + 5 μM GA₃ + 1 μM TSA tokom 7d, a zatim subkultivisanih na medijum istog sastava bez TSA tokom još 3 nedelje.

Pri kombinaciji 1 μM NAA + 5 μM GA₃ + TSA, najveći procenat embriogenih eksplantata je bio 10.22 ± 2.19 , sa najviše 0.094 ± 0.017 SE po eksplantatu posle 12 nedelja kultivacije, dok su za isto vreme kontrolni eksplantati kultivisani na IMSE bez DMSO regenerisali sa frekvencom $86.54 \pm 1.02\%$ i prosečno 6.92 ± 0.09 SE po eksplantatu. Dužina TSA tretmana ($p \leq 0.05$) je statistički značajno uticala na frekvencu regeneracije i broj SE po eksplantatu, dok koncentracija TSA nije statistički značajno uticala na ove dve variable (Tabela 12). Najveće vrednosti frekvence regeneracije i prosečnog broja SE po eksplantatu su dobijene posle 7 dana izlaganja 1 μM TSA. Zanimljivo je da su frekvencu regeneracije i broj SE po eksplantatu bili veći i kod eksplantata koji nisu bili izloženi TSA, ali su bili izloženi dejstvu DMSO tokom 7 dana, što ukazuje da je DMSO, koji je korišćen kao rastvarač TSA, takođe uticao na povećanje embriogenog potencijala eksplantata (Tabela 12). I pored uticaja DMSO, vrednosti frekvence regeneracije i prosečnog broja SE po eksplantatu su bile veće kod eksplantata koji

su bili izloženi dejstvu TSA, što ukazuje na njegovo stimulatívno dejstvo na proces somatske embriogeneze iz odsečaka korenova spanaća (Tabela 12).

Tabela 12. Uticaj trihostatina (TSA) na regeneraciju somatskih embriona iz apikalnih odsečaka lateralnih korenova spanaća. Eksplantati su kultivisani na medijumu sa 1 μ M NAA + 5 μ M GA₃ + 0, 0.1, 0.5, 1 ili 5 μ M TSA tokom 1, 7 ili 14 dana, a zatim su subkultivisani na medijumu sa 1 μ M NAA + 5 μ M GA₃ bez TSA. TSA je rastvoren u DMSO. Jedna kontrolna grupa eksplantata je kultivisana na medijumu sa DMSO bez TSA, a druga na medijumu bez DMSO i TSA. Medijumi sa DMSO su sadržali 0.05% DMSO. SE su kvantifikovani posle 8 i 12 nedelja. Za svaki tretman je postavljeno 5 petri kutija sa po 6 eksplantata (n=30). Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška. Za sve tretmane i kontrolu je korišćen genetički jednak uzorak. Slova označavaju statističku značajnost između tretmana u okviru jedne kolone, ne uzimajući u obzir kontrole eksplantate kultivisane na medijumu bez DMSO. Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite prema LSD testu. Zvezdice označavaju statističku značajnost tretmana u odnosu na kontrolne eksplantate kultivisane na medijumu bez DMSO, određenu prema t testu za zavisne uzorke pri čemu je: * $p \leq 0.05$. Rezultati ANOVA su prikazani za nezavisne variable i njihovu interakciju.

Dužina tretmana (dan)	TSA (μ M)	8 nedelja			12 nedelja		
		Frekvencija regeneracije (%)	Broj SE	EP	Frekvencija regeneracije (%)	Brj SE	EP
‡Kontrola bez DMSO	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0.71 \pm 0.71 ab	0.003 \pm 0.003 ab	0.017 \pm 0.017	2.81 \pm 1.06 ab	0.006 \pm 0.003 ab	0.006 \pm 0.006
	0.1	0 b	0 b	0	4.23 \pm 1.69 ab	0.046 \pm 0.018 ab	0.183 \pm 0.176
	0.5	0.71 \pm 0.71 ab	0.005 \pm 0.005 ab	0.028 \pm 0.028	0.71 \pm 0.71 ab	0.007 \pm 0.007 ab	0.033 \pm 0.033
	1	0 b	0 b	0	0 b	0 b	0
	5	0 b	0 b	0	0 b	0 b	0
7	0	4.23 \pm 1.69 ab	0.036 \pm 0.011 ab	0.105 \pm 0.086	4.23 \pm 1.69 ab	0.058 \pm 0.014 ab	0.122 \pm 0.097
	0.1	2.81 \pm 1.06 ab	0.006 \pm 0.003 ab	0.017 \pm 0.011	8.25 \pm 1.53 ab	0.049 \pm 0.013 ab	0.083 \pm 0.037
	0.5	2.81 \pm 1.06 ab	0.045 \pm 0.014 a	0.072 \pm 0.054	6.24 \pm 1.06 ab	0.038 \pm 0.012 ab	0.067 \pm 0.032
	1	6.24 \pm 1.06 a	0.033 \pm 0.010 ab	0.045 \pm 0.027	10.22 \pm 2.19 a	0.094 \pm 0.017 a *	0.222 \pm 0.175
	5	0.71 \pm 0.71 ab	0.005 \pm 0.005 ab	0.033 \pm 0.075	6.24 \pm 1.06 ab	0.030 \pm 0.009 ab	0.050 \pm 0.020
14	0	0.71 \pm 0.71 ab	0.005 \pm 0.005 ab	0.028 \pm 0.028	2.81 \pm 1.06 ab	0.009 \pm 0.004 ab	0.022 \pm 0.013
	0.1	1.50 \pm 1.50 ab	0.020 \pm 0.010 ab	0.100 \pm 0.100	4.23 \pm 1.69 ab	0.036 \pm 0.012 ab	0.106 \pm 0.076
	0.5	2.81 \pm 1.06 ab	0.010 \pm 0.005 ab	0.028 \pm 0.022	4.23 \pm 1.69 ab	0.027 \pm 0.009 ab	0.072 \pm 0.046
	1	0.71 \pm 0.71 ab	0.005 \pm 0.005 ab	0.028 \pm 0.028	2.81 \pm 1.06 ab	0.010 \pm 0.005 ab	0.028 \pm 0.022
	5	0 b	0 b	0	0.71 \pm 0.71 ab	0.003 \pm 0.003 ab	0.017 \pm 0.017
Dužina tretmana (A)		0.036716	0.032307	NZ	0.043790	0.030168	NZ
Koncentracija TSA (B)		NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
AxB		NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ

NZ - nema statističke značajnosti između tretmana. ‡ Kontrolni medijum je sažao 1 μ M NAA + 5 μ M GA₃ bez DMSO

S obzirom na pozitivno dejstvo DMSO na somatsku embriogenezu, embriogeni potencijal eksplantata je upoređen sa kontrolnim eksplantatima kultivisanim na medijumu istog sastava bez DMSO i TSA. Kontrolni eksplantati nisu regenerisali SE, a t test za zavisne uzorke je pokazao statističku značajnost ($p \leq 0.05$) samo između kontrolnih eksplanta i eksplantata kultivisanih na medijumu sa $1 \mu\text{M}$ TSA tokom 7 dana (Tabela 12). Ova značajnost se odnosi samo na broj SE po eksplantatu, dok frekvencija regeneracije i EP indeks nisu bili statistički značajno različiti između kontrolne grupe i grupa eksplantata izloženih ostalim tretmanima.

Eksplantati kultivisani na medijumu sa $10 \mu\text{M}$ NAA + $5 \mu\text{M}$ GA₃ + TSA su imali znatno veći embriogeni odgovor u odnosu na eksplantate kultivisane na medijumu sa $1 \mu\text{M}$ NAA + $5 \mu\text{M}$ GA₃ + TSA. Procenat eksplantata koji su regenerisali SE je već posle 8 nedelja kultivacije dostizao i do 95.77% (Tabela 13). Na ovu promenljivu je statistički značajno uticala dužina TSA tretmana, dok koncentracija TSA u medijumu u okviru jednog vremenskog tretmana nije značajno uticala na frekvenciju regeneracije SE. Najveću frekvenciju regeneracije su imali eksplantati kultivisani na medijumu sa $0.1 \mu\text{M}$ TSA tokom 14 dana. Međutim, frekvencija regeneracije eksplantata kultivisanih na medijumu sa i bez TSA nije bila statistički značajno različita, što ukazuje i na značajan pozitivan uticaj DMSO na indukciju somatske embriogeneze. Prisustvo TSA u nižim koncentracijama je takođe doprinelo povećanju frekvence regeneracije, dok je $5 \mu\text{M}$ TSA uticao inhibitorno na somatsku embriogenezu pri dužim tretmanima. Ova koncentracija TSA je imala stimulatívni efekat pri tretmanu od 24 h. Broj SE posle 8 nedelja među eksplantatima koji su bili kultivisani na medijumu sa TSA tokom 24h je takođe bio najveći kod eksplantata kultivisanih na medijumu sa $5 \mu\text{M}$ TSA, da bi broj SE bio značajno veći kod eksplantata kultivisanih na medijumu sa TSA tokom 7 i 14 dana, osim kod onih koji su bili kultivisani na medijumu sa $5 \mu\text{M}$ TSA (Tabela 13). Na broj SE po eksplantatu, značajno su uticali dužina tretmana i koncentracija TSA, kao i njihova interakcija. Najveći broj SE po eksplantatu posle 8 nedelja kultivacije je dobijen kod eksplantata kultivisanih na medijumu sa $0.1 \mu\text{M}$ TSA tokom 7 odnosno 14 dana (7.64, odnosno 6.80 SE). Slično tome, EP indeks je bio najveći za eksplantate kultivisane 7 dana na medijumu sa $0.1 \mu\text{M}$ TSA (Tabela 13). Na EP indeks su takođe značajno uticali dužina tretmana i koncentracija TSA, kao i njihova interakcija (Tabela 13).

Posle 12 nedelja kultivacije, frekvencija regeneracije eksplantata izloženih svim tretmanima su bile visoke, u opsegu 70-97%, i dužina tretmana i koncentracija TSA nisu značajno uticali na frekvenciju regeneracije i EP indeks, dok je na prosečan broj SE po eksplantatu značajno uticala samo dužina TSA tretmana. Najveći prosečan broj SE po eksplantatu (10.25 ± 0.09) su i dalje imali eksplantati kultivisani na medijumu sa $0.1 \mu\text{M}$ TSA tokom 7 dana (Tabela 13).

Na Sl. 19 je prikazan genetički identičan biljni materijal izložen svim tretmanima. Ovi eksplantati su izolovani sa 6 klijanaca, a po jedan koren svakog od njih je postavljen istim redosledom na svaki medijum i kontrolu. Uočljivo je da se broj SE povećava sa dužinom TSA tretmana u okviru jedne koncentracije TSA. U slučaju jednodnevnog TSA tretmana, broj SE se povećao sa koncentracijom TSA, dok je pri dužim tretmanima broj SE bio veći kod eksplantata kultivisanih na medijumu sa nižim koncentracijama TSA, da bi opao kod eksplantata kultivisanih na medijumu sa $1 \mu\text{M}$ i $5 \mu\text{M}$ TSA. Rezultati prikazani na Sl. 19 su u potpunoj saglasnosti sa rezultatima prikazanim u Tabeli 13. Osim toga, na Sl. 19 se može uočiti da eksplantati konzistentno odgovaraju na svim tretmanima, tj. isti eksplantati daju najveći broj SE na svim tretmanima, ilustrujući time veliku varijabilnost između jedinki uključenih u eksperiment.

Kontrolni eksplantati kultivisani na medijumu sa $10 \mu\text{M}$ NAA + $5 \mu\text{M}$ GA₃ bez DMSO i TSA su imali vrlo nizak embriogeni potencijal ($EP=0.27 \pm 0.08$). Svi parametri, frekvencija regeneracije, prosečan broj SE po eksplantatu i EP indeks, su bili statistički značajno veći za eksplantate kultivisane na medijumu sa DMSO (Tabela 13). (Nivo značajnosti između kontrole bez DMSO i ostalih grupa

eksplantata je označen zvezdicama u Tabeli 13). Ovo se sa najvećim nivoom značajnosti ($p \leq 0.0001$) odnosi na prosečan broj SE po eksplantatu.

Grupa klijanaca nasumično izabrana za ovaj eksperiment je imala niži embriogeni potencijal od prethodnih grupa. Kontrolni eksplantati, kultivisani na IMSE bez DMSO, su imali EP indeks samo 1.49 ± 0.48 posle 12 nedelja kultivacije, dok se EP indeks eksplantata kultivisanih na medijumu sa $10 \mu\text{M NAA} + 5 \mu\text{M GA}_3 + \text{TSA}$ kretao u opsegu od 4.80 do 10.79. Dakle, visok embriogeni potencijal eksplantata se može pripisati kako pozitivnom dejstvu DMSO i TSA, tako i odnosu NAA i GA_3 u medijumu.

Kod eksplantata kultivisanih na medijumu sa $20 \mu\text{M NAA} + 5 \mu\text{M GA}_3 + \text{TSA}$ (IMSE + TSA), na frekvencu regeneracije, prosečan broj SE po eksplantatu i EP indeks značajno je uticala samo dužina TSA tretmana (Tabela 14). Za razliku od prethodne grupe eksplantata, kultivisanih na medijumu sa $10 \mu\text{M NAA}$, kod ovih eksplantata je TSA tretman u trajanju od samo 24 h bio dovoljan za dostizanje visokog embriogenog potencijala (Tabela 14, Sl. 20). Statistički značajna razlika između kontrolnih eksplantata i eksplantata kultivisanih na istom medijumu bez TSA još jednom ukazuje na značajnu pozitivnu ulogu DMSO u indukciji procesa somatske embriogeneze. Naime, jedina razlika u kultivaciji ovih eksplantata je u odsustvu DMSO u kontrolnom medijumu. U odnosu na eksplantate kultivisane na kontrolnom medijumu, samo su eksplantati kultivisani tokom 24 h ili 7 dana na medijumu sa TSA imali statistički značajno veći embriogeni potencijal od kontrolnih eksplantata, dok su eksplantati izloženi TSA tokom 14 dana imali tek neznatno veći embriogeni potencijal od kontrolnih eksplantata, što ukazuje na izostanak pozitivnog dejstva DMSO i TSA na indukciju somatske embriogeneze pri dužem tretmanu.

Na Sl. 20 je prikazan genetički identičan biljni materijal izložen svim tretmanima. Rezultati prikazani na Sl. 20 su u potpunoj saglasnosti sa rezultatima prikazanim u Tabeli 13. Kao i u prethodnom slučaju, jasno je uočljiva varijabilnost biljnog materijala.

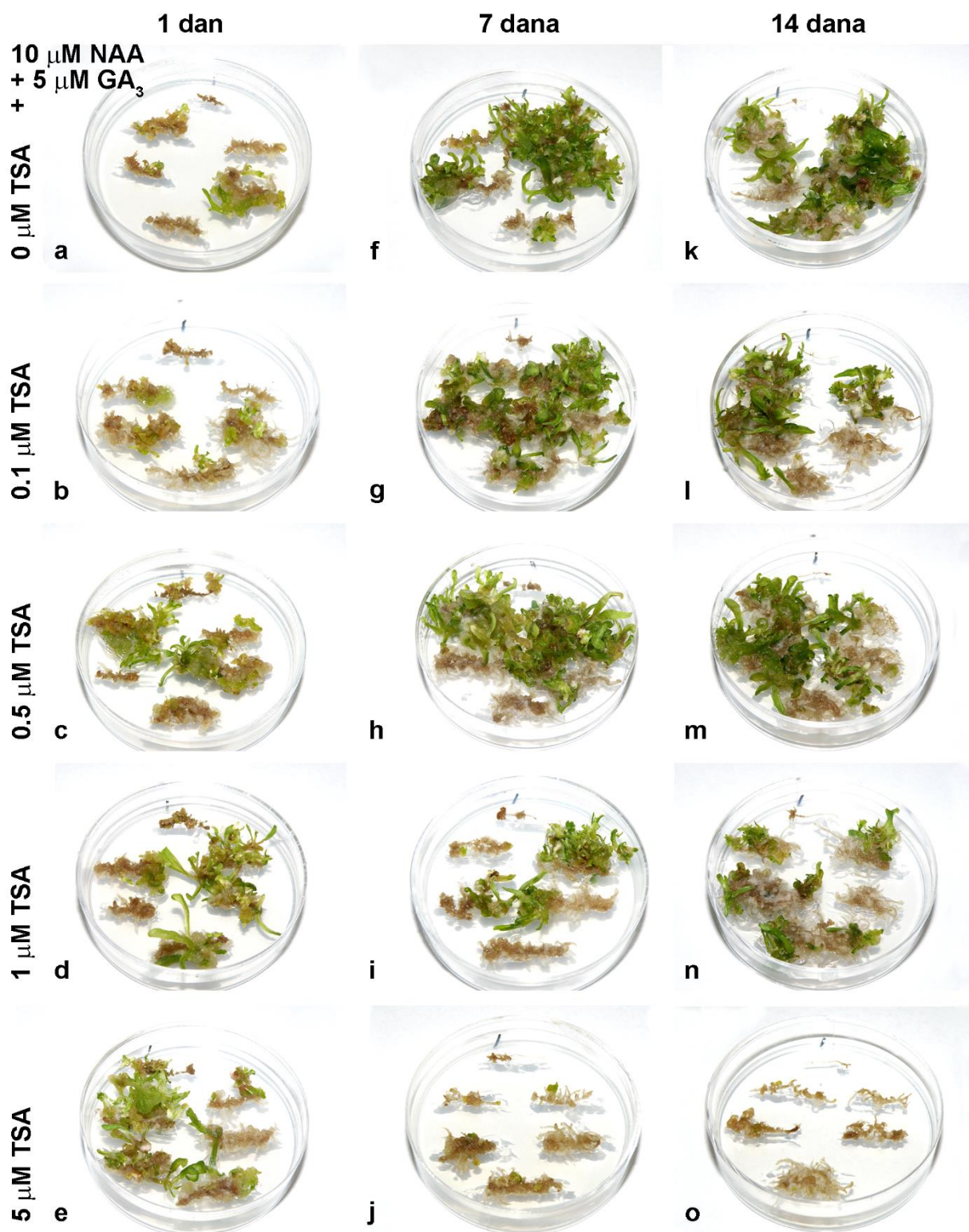
Ova grupa klijanaca je imala veći EP indeks posle 12 nedelja kultivacije (5.81 ± 1.29) od grupe klijanaca korićene za prethodni eksperiment (1.49 ± 0.48), tako da se nešto veći embriogeni potencijal može pripisati i nešto većoj genetičkoj predispoziciji ovih klijanaca prema regeneraciji SE.

Eksplantati kultivisani u odsustvu DMSO su imali i do 2.5 puta manji EP indeks (Tabela 14), ali je nivo značajnosti između prosečnog broja SE kod eksplantata kultivisanih na medijumu sa i bez DMSO bio značajno niži ($p \leq 0.01$) u odnosu na prethodnu grupu.

Tabela 13. Uticaj trihostatina (TSA) na regeneraciju somatskih embriona iz apikalnih odsečaka lateralnih korenova spanača. Eksplantati su kultivisani na medijumu sa 10 μM NAA + 5 μM GA₃ + 0, 0.1, 0.5, 1 ili 5 μM TSA tokom 1, 7 ili 14 dana, a zatim su subkultivisani na medijum sa 10 μM NAA + 5 μM GA₃ bez TSA. Jedna kontrolna grupa eksplantata je kultivisana na medijumu sa DMSO bez TSA, a druga na medijumu bez DMSO i TSA. Medijumi sa DMSO su sadržali 0.05% DMSO. SE su kvantifikovani posle 8 i 12 nedelja. Za svaki tretman je postavljeno 5 petri kutija sa po 6 eksplantata (n=30). Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška. Za sve tretmane i kontrolu je korišćen genetički jednak uzorak. Slova označavaju statističku značajnost između tretmana u okviru jedne kolone, ne uzimajući u obzir kontrolne eksplantate kultivisane na medijumu bez DMSO. Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite prema LSD testu. Zvezdice označavaju statističku značajnost tretmana u odnosu na kontrolne eksplantate kultivisane na medijumu bez DMSO, određenu prema t testu za zavisne uzorke, pri čemu je: *p \leq 0.05, ** p \leq 0.01 i *** p \leq 0.001. Rezultati ANOVA su prikazani za nezavisne variable i njihovu interakciju

Dužina tretmana (dan)	TSA (μM)	8 nedelja			12 nedelja		
		Frekvencija regeneracije (%)	Broj SE	EP	Frekvencija regeneracije (%)	Brj SE	EP
‡Kontrola bez DMSO	0	19.18 \pm 1.42	0.074 \pm 0.009	0.10 \pm 0.04	36.09 \pm 0.46	0.23 \pm 0.01	0.27 \pm 0.08
1	0	44.99 \pm 4.06 de *	1.55 \pm 0.07 c ***	2.35 \pm 0.85 d	72.19 \pm 3.71 bc	3.97 \pm 0.09 cd ***	5.50 \pm 1.76 b *
	0.1	36.73 \pm 7.02 e	1.57 \pm 0.08 c **	3.14 \pm 1.49 cd	79.39 \pm 3.65 abc	4.76 \pm 0.11 bcd ***	7.85 \pm 1.99 ab *
	0.5	50.0 \pm 1.61 cde *	1.58 \pm 0.07 c ***	2.66 \pm 1.52 d	78.47 \pm 2.39 abc *	6.50 \pm 0.13 abcd ***	8.45 \pm 2.46 ab *
	1	50.0 \pm 1.61 cde	1.35 \pm 0.07 c **	2.18 \pm 1.14 d	70.74 \pm 0.47 c *	3.90 \pm 0.09 d ***	4.80 \pm 1.41 b *
	5	72.19 \pm 2.69 bcd *	3.34 \pm 0.09 bc ***	4.74 \pm 1.83 bcd	89.48 \pm 1.93 abc *	6.24 \pm 0.08 abcd ***	7.62 \pm 2.32 ab *
7	0	77.53 \pm 0.53 abcd ***	5.74 \pm 0.08 ab ***	6.36 \pm 1.03 abc **	89.77 \pm 2.19 abc *	6.82 \pm 0.06 abcd ***	7.58 \pm 2.02 ab *
	0.1	83.3 \pm 0 ab **	7.64 \pm 0.10 a ***	8.75 \pm 1.44 a **	83.3 \pm 0 abc *	10.25 \pm 0.09 a ***	10.79 \pm 0.97 a ***
	0.5	73.79 \pm 0.22 abcd *	6.04 \pm 0.11 ab ***	6.62 \pm 0.66 ab ***	81.20 \pm 1.71 abc *	8.21 \pm 0.11 ab ***	8.79 \pm 0.97 ab ***
	1	73.79 \pm 0.22 abcd **	5.37 \pm 0.10 ab ***	6.03 \pm 0.49 abc ***	80.82 \pm 1.42 abc *	7.79 \pm 0.11 abc ***	8.48 \pm 1.15 ab **
	5	67.15 \pm 0.33 bcde *	1.99 \pm 0.06 c ***	2.45 \pm 0.34 d **	83.78 \pm 1.26 abc *	6.01 \pm 0.09 abcd ***	6.77 \pm 0.92 ab **
14	0	83.3 \pm 0 ab **	5.39 \pm 0.06 ab ***	5.60 \pm 0.83 abc **	89.08 \pm 0.71 abc **	6.04 \pm 0.05 abcd ***	6.46 \pm 0.73 b ***
	0.1	95.77 \pm 1.69 a ***	6.80 \pm 0.05 a ***	7.62 \pm 1.39 ab **	97.19 \pm 1.06 a **	7.21 \pm 0.04 abcd ****	7.89 \pm 1.11 ab **
	0.5	80.31 \pm 0.15 abc **	6.41 \pm 0.08 ab ***	7.11 \pm 0.99 ab **	89.08 \pm 0.71 abc **	7.12 \pm 0.06 abcd ***	7.69 \pm 0.65 ab ***
	1	80.82 \pm 1.42 abc *	5.90 \pm 0.08 ab ***	6.31 \pm 0.60 abc **	95.7 \pm 1.69 ab **	7.32 \pm 0.05 abcd ****	8.06 \pm 1.54 ab **
	5	53.88 \pm 0.77 bcde	1.57 \pm 0.07 c **	2.41 \pm 1.46 d	81.20 \pm 1.71 abc *	5.85 \pm 0.08 abcd **	6.23 \pm 0.75 b **
Dužina tretmana (A)		0.000270	P=0.000000	0.000089	NZ	0.010788	NZ
Koncentracija TSA (B)		NZ	P=0.026157	0.017941	NZ	NZ	NZ
AxB		NZ	P=0.006482	0.031765	NZ	NZ	NZ

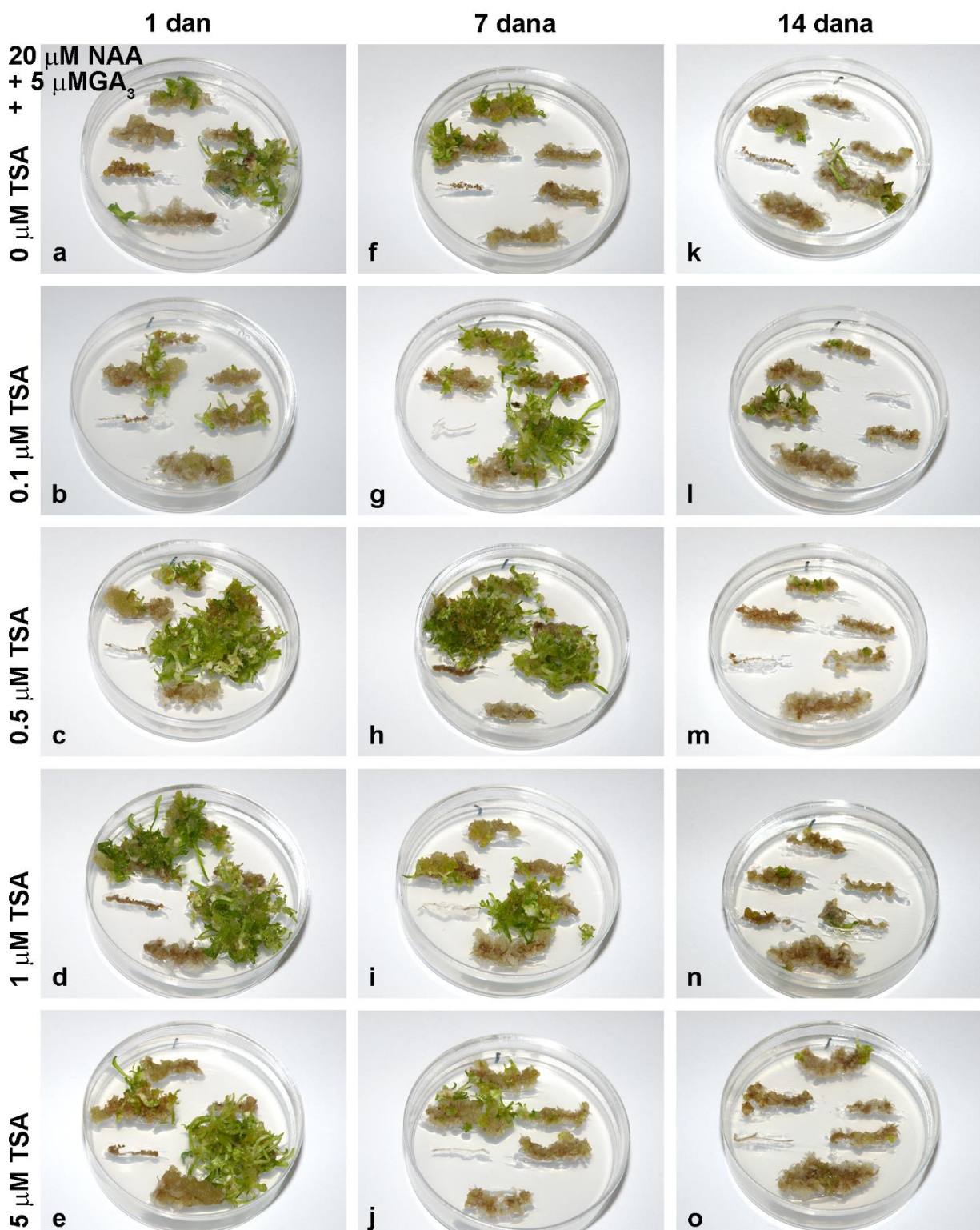
NZ - nema statističke značajnosti između tretmana. ‡ Kontrolni medijum je sačinjavao 10 μM NAA + 5 μM GA₃ bez DMSO i TSA.



Slika 19. Uticaj koncentracije i dužine tretmana trihostatonom (TSA) u kombinaciji sa 10 μM NAA + 5 μM GA₃ na indukciju regeneracije somatskih embriona iz apikalnih odsečaka korenova spanaća. TSA je primenjen u koncentraciji: **a,f,k**) 0 μM , **b,g,l**) 0.1 μM , **c,h,m**) 0.5 μM , **d,i,n**) 1 μM ili **e,j,o**) 5 μM , a tretman je trajao: **a-e**) 1 dan, **f-j**) 7 dana ili **k-o**) 14 dana, posle čega su eksplantati kultivisani na medijumu bez TSA. TSA je rastvoren u DMSO. U sve medijume je dodat 0.05% DMSO. Na sve tretmane su istim redosledom postavljeni korenovi izolovani sa 6 klijanaca (jedan koren izolovan sa jednog klijanca po tretmanu). Objekti su snimljeni posle 8 nedelja kultivacije.

Tabela 14. Uticaj trihostatina (TSA) na regeneraciju somatskih embriona iz apikalnih odsečaka lateralnih korenova spanača. Eksplantati su kultivisani na medijumu sa 20 μM NAA + 5 μM GA₃ + 0, 0.1, 0.5, 1 ili 5 μM TSA tokom 1, 7 ili 14 dana, a zatim su subkultivisani na medijum sa 20 μM NAA + 5 μM GA₃ bez TSA. TSA je rastvoren u DMSO. Jedna kontrolna grupa eksplantata je kultivisana na medijumu sa DMSO bez TSA, a druga na medijumu bez DMSO i TSA. Medijumi sa DMSO su sadržali 0.5 μl /ml DMSO. SE su kvantifikovani posle 8 i 12 nedelja. Za svaki tretman je postavljeno 5 petri kutija sa po 6 eksplantata (n=30). Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška. Za sve tretmane i kontrolu je korišćen genetički jednak uzorak. Slova označavaju statističku značajnost između tretmana u okviru jedne kolone, ne uzimajući u obzir kontrole eksplantate kultivisane na medijumu bez DMSO. Vrednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite prema LSD testu. Zvezdice označavaju statističku značajnost tretmana u odnosu na kontrolne eksplantate kultivisane na medijumu bez DMSO, određenu prema t testu za zavisne uzorke, pri čemu je: *p \leq 0.05, ** p \leq 0.01 i *** p \leq 0.001. Rezultati ANOVA su prikazani za nezavisne variable i njihovu interakciju. NZ - nema statističke značajnosti između tretmana. ‡ Kontrolni medijum je saržao 20 μM NAA + 5 μM GA₃ bez DMSO i TSA.

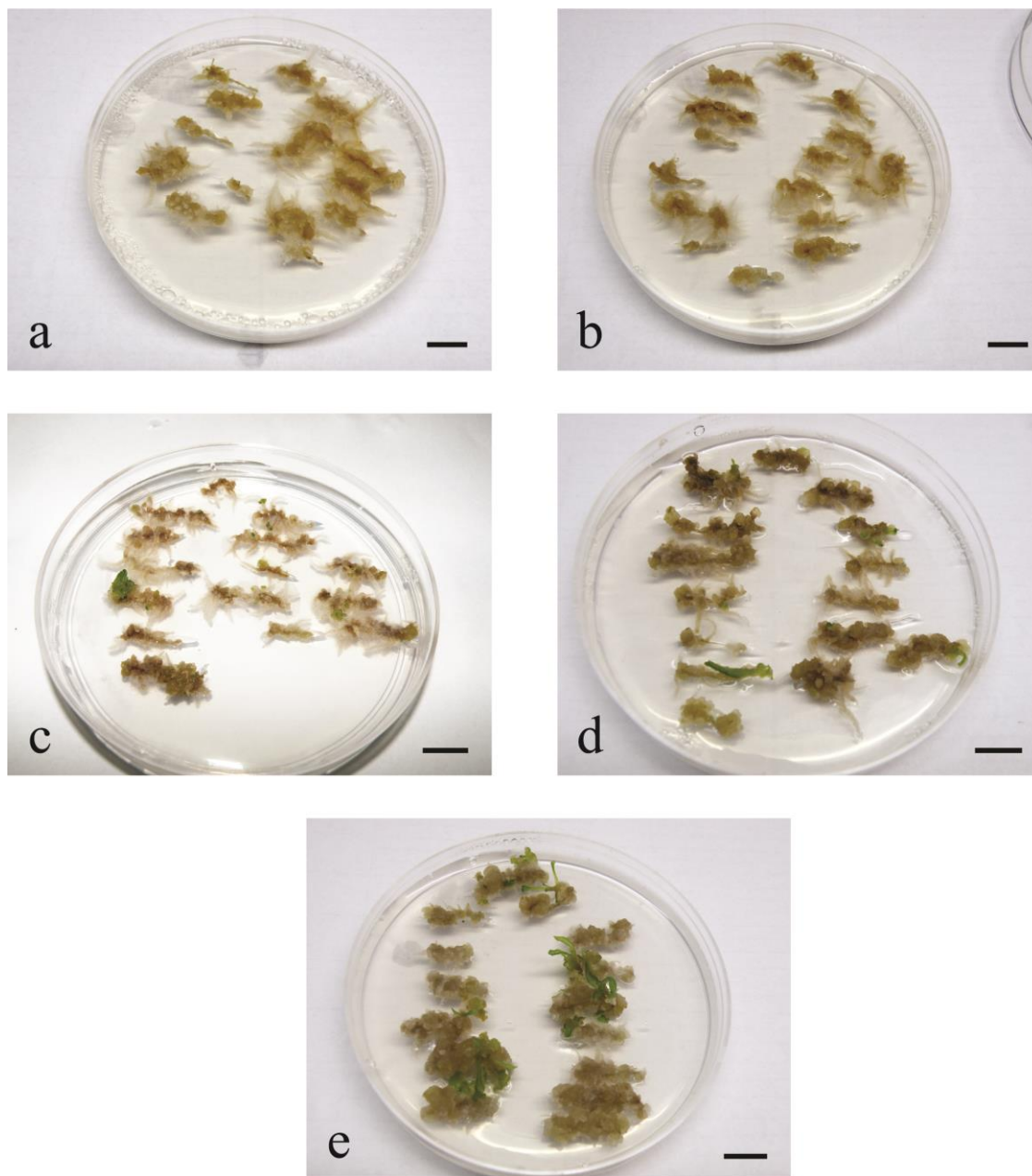
Dužina tretmana (dan)	TSA (μM)	8 nedelja			12 nedelja		
		Frekvencija regeneracije (%)	Broj SE	EP	Frekvencija regeneracije (%)	Brj SE	EP
‡Kontrola bez DMSO	0	67.15 \pm 0.33	3.72 \pm 0.10	4.82 \pm 1.76	77.53 \pm 0.53	5.24 \pm 0.07	5.81 \pm 1.29
1	0	74.21 \pm 0.54	6.58 \pm 0.16 ab	8.58 \pm 2.24 ab	97.19 1.06 *	11.01 \pm 0.07 abc **	12.49 \pm 2.60 abc *
	0.1	82.07 \pm 3.25	7.51 \pm 0.14 abcd	8.57 \pm 1.90 ab	89.08 0.71	12.06 \pm 0.09 a **	12.61 \pm 1.25 abc *
	0.5	83.78 \pm 1.26 *	7.87 \pm 0.16 a *	10.84 \pm 3.44 a *	93.75 1.06	12.24 \pm 0.09 a **	13.71 \pm 2.70 a **
	1	84.95 \pm 3.05	6.56 \pm 0.14 abcd	9.25 \pm 3.35 ab	84.13 1.54	10.94 \pm 0.12 abc *	12.27 \pm 2.53 abcd *
	5	74.21 \pm 0.54	4.50 \pm 0.16 abcde	6.66 \pm 2.04 abc	93.75 1.06	9.61 \pm 0.09 abc *	11.22 \pm 2.00 abcd *
7	0	64.37 \pm 1.08	5.94 \pm 0.17 abcd	7.81 \pm 2.38 abc	93.75 1.06	11.51 \pm 0.10 ab **	13.29 \pm 3.23 abc
	0.1	81.20 \pm 1.71	7.67 \pm 0.11 a	9.03 \pm 2.57 ab	89.08 0.71	12.52 \pm 0.10 a **	13.56 \pm 2.44 ab *
	0.5	60.61 \pm 0.81	5.45 \pm 0.17 abcd	7.44 \pm 2.56 abc	97.19 1.06 *	13.08 \pm 0.10 a **	15.10 \pm 2.64 a *
	1	71.76 \pm 2.38	7.06 \pm 0.17 abc	9.23 \pm 3.49 ab	86.54 1.02	12.27 \pm 0.12 a **	13.71 \pm 2.82 a
	5	73.79 \pm 0.22	5.29 \pm 0.15 abcd	7.32 \pm 2.04 abc	93.75 1.06	9.51 \pm 0.12 abc *	11.52 \pm 1.83 abcd
14	0	63.91 \pm 0.46	2.49 \pm 0.09 de	3.43 \pm 1.20 bc	83.3 0	6.46 \pm 0.08 bcd	7.30 \pm 1.20 bcd
	0.1	64.37 \pm 2.11	2.49 \pm 0.08 de	3.64 \pm 1.48 bc	81.60 2.28	6.10 \pm 0.09 cd	7.43 \pm 1.98 bcd
	0.5	78.47 \pm 2.10	2.75 \pm 0.07 cde	3.55 \pm 1.12 bc	89.48 1.93	6.46 \pm 0.08 bcd	7.40 \pm 1.64 bcd
	1	78.07 \pm 1.81	3.13 \pm 0.08 bcde	4.15 \pm 1.40 bc	83.78 1.26	6.31 \pm 0.09 cd	7.23 \pm 1.28 cd
	5	56.79 \pm 0.46	1.44 \pm 0.05 e *	1.83 \pm 0.45 c	78.47 3.41	4.65 \pm 0.08 d	6.04 \pm 1.83 d
Dužina tretmana (A)	NZ	P=0.000004	0.000519	NZ	0.000000	0.000044	
Koncentracija TSA (B)	NZ	P=0.516835	NZ	NZ	NZ	NZ	
AxB	NZ	P=0.989400	NZ	NZ	NZ	NZ	



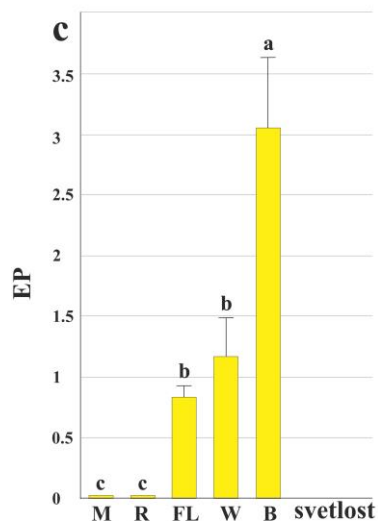
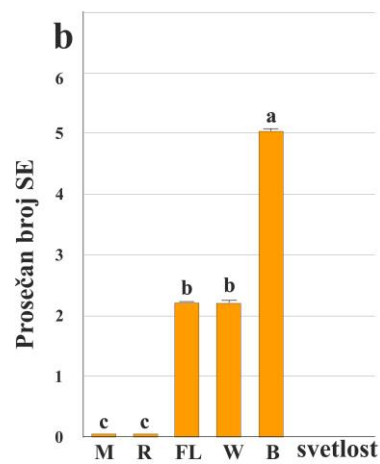
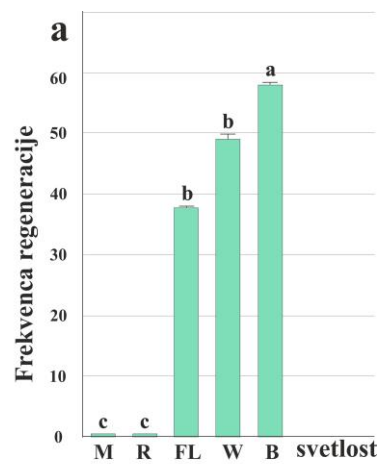
Slika 20. Uticaj koncentracije i dužine tretmana trihostatinom (TSA) u kombinaciji sa 20 μM NAA + 5 μM GA₃ na indukciju regeneracije somatskih embriona iz apikalnih odsečaka korenova spanaća. TSA je primenjen u koncentraciji: **a,f,k** 0 μM , **b,g,l** 0.1 μM , **c,h,m** 0.5 μM , **d,i,n** 1 μM ili **e,j,o** 5 μM , a tretman je trajao: **a-e** 1 dan, **f-j** 7 dana ili **k-o** 14 dana, posle čega su eksplantati kultivisani na medijumu bez TSA. TSA je rastvoren u DMSO. U sve medijume je dodat 0.05% DMSO. Na sve tretmane su istim redosledom postavljeni korenovi izolovani sa 6 klijanaca (jedan koren izolovan sa jednog klijanaca po tretmanu). Objekti su snimljeni posle 8 nedelja kultivacije.

4.1.6. Svetlost

Kako bi se ispitalo koji deo vidljivog spektra svetlosti utiče na pokretanje procesa somatske embriogeneze, apikalni odsecci korenova SI klijanaca su kultivisani u mraku ili u uslovima osvetljenja Fl ili LED lampi. Eksplantati koji su bili kultivisani u mraku ili pod R LED svetlošću nisu regenerisali SE tokom čitavog perioda kultivacije od 8 nedelja i morfološki se međusobno nisu mogli razlikovati (Sl. 21a,b). Do proliferacije i regeneracije SE je došlo u eksplantatima koji su bili izloženi dejstvu FL, W i B LED svetlosti (Sl. 21c,d,e).



Slika 21. Indukcija somatske embriogeneze iz apikalnih odsečaka korenova spanaća gajenih na IMSE tokom 8 nedelja u mraku ili pod svetlošću fluorescentnih lampi (FL) ili LED panela. **a)** Mrak. **b)** R LED svetlost. **c)** Fl svetlost. **d)** W LED svetlost. **e)** B LED svetlost.

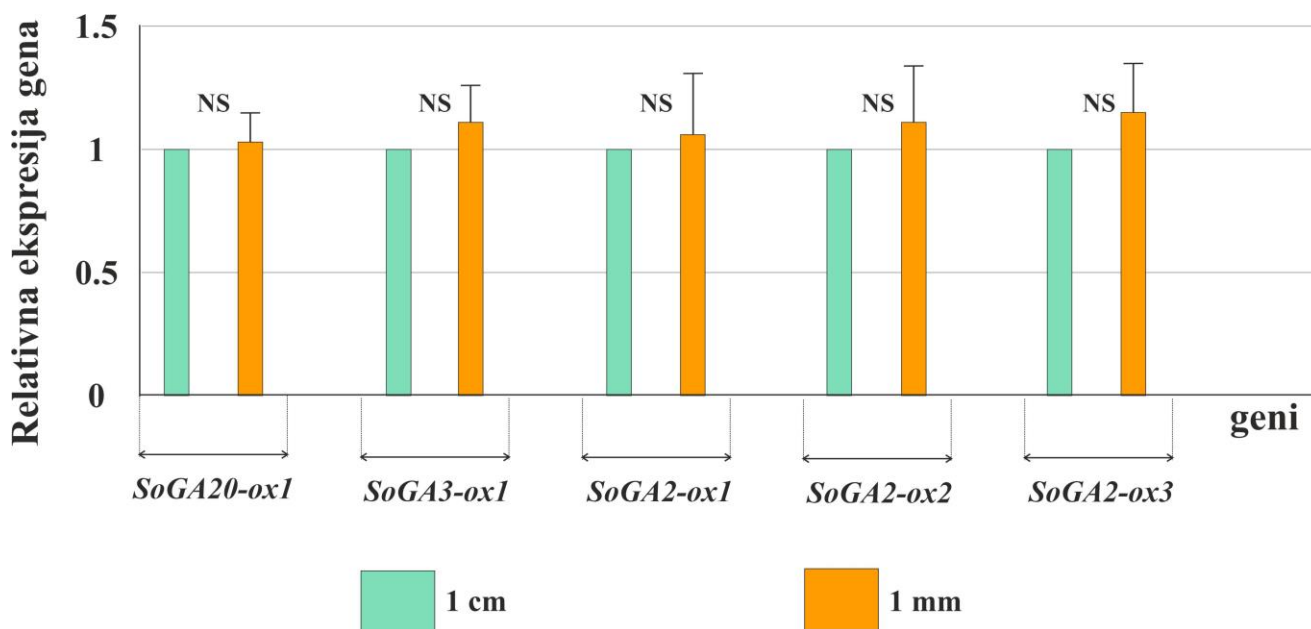


Slika 22. Uticaj svetlosti različitih talasnih dužina na embriogeni potencijal apikalnih odsečaka korenova spanaća kultivisanih na IMSE tokom 8 nedelja u mraku ili pod svetlošću FL ili LED lampi. **(a)** Frekvencna regeneracije. **(b)** Prosečan broj SE po eksplantatu. **(c)** EP indeks. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška. Za svaki tretman su postavljene tri petri kutije sa po 15 fragmenata korenova ($n=45$). M-mrak, R-crvena LED svetlost, FL- svetlost fluorescentnih lampi, W-bela LED svetlost, B-plava LED svetlost. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu.

Kvalitet svetlosti je statistički značajno uticao na frekvencu regeneracije ($p \leq 0.000001$), prosečan broj SE po eksplantatu ($p \leq 0.000003$) i EP indeks ($p \leq 0.002$) (Sl. 22a, b, c). Najveću efikasnost regeneracije su imali eksplantati koji su bili gajeni pod B LED svetlošću, sa frekvencom regeneracije koja je iznosila $57.85\% \pm 0.36$ (Sl. 22a), prosečnim brojem SE od 5.02 ± 0.04 (Sl. 22b) i EP indeksom 2.9 ± 0.77 (Sl. 22c). Embriogeni potencijal eksplantata (izražen kroz frekvencu regeneracije, prosečan broj SE po eksplantatu i EP indeks) kultivisanih pod FL i W LED svetlošću se nije statistički značajno razlikovao (Sl. 22a, b, c).

4.3. Analiza ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina u eksplantatima tokom indukcije somatske embriogeneze

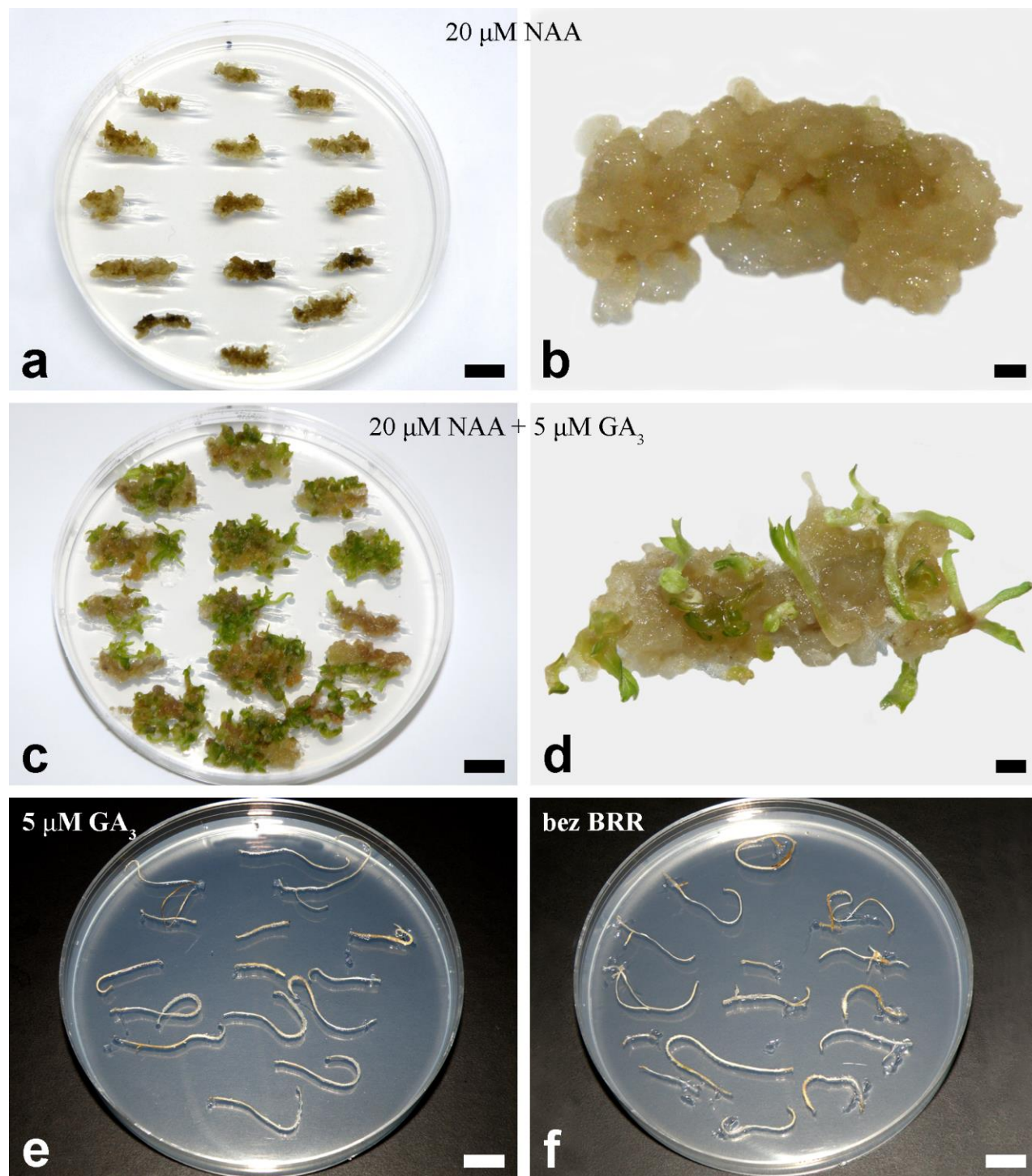
Da bi se utvrdilo kolika veličina eksplantata je pogodna za analizu ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za biosintezu (GA20-ox1 i GA3-ox1) i inaktivaciju (GA2-ox1, GA2-ox2 i GA2-ox3) GA, najpre je analizirana ekspresija ovih gena u apikalnim odsečcima korenova dužine 1 cm ili 1 mm. Ekspresija svih navedenih gena je bila nešto veća u eksplantatima dužine 1 mm, ali te razlike nisu bile statistički značajne u odnosu na ekspresiju odgovarajućih gena u eksplantatima dužine 1 cm (Sl. 23). Iz praktičnih razloga, radi lakše izolacije eksplantata, u svim daljim eksperimentima ekspresija navedenih gena je analizirana u eksplantatima dužine 1cm.



Slika 23. Ekspresija *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1*, *SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3* u apikalnim odsečcima korenova veličine 1cm ili 1 mm. Eksplantati su izolovani sa 15 nasumično odabranih klijanaca iz populacije, nakon čega su zamrznuti u tečnom azotu. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati veličine 1 cm. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin upotrebom $\Delta\Delta C_t$ metoda. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Statistička značajnost je određena t-testom za zavisne uzorke. NS - nema statistički značajnih razlika.

Profil ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam GA je praćen tokom 4 nedelje u eksplantatima kultivisanim na IMSE, medijumu bez BRR ili medijumu koji je od BRR sadržao 20 μ M NAA ili 5 μ M GA₃. U preliminarnim istraživanjima ekspresija ovih gena je analizirana

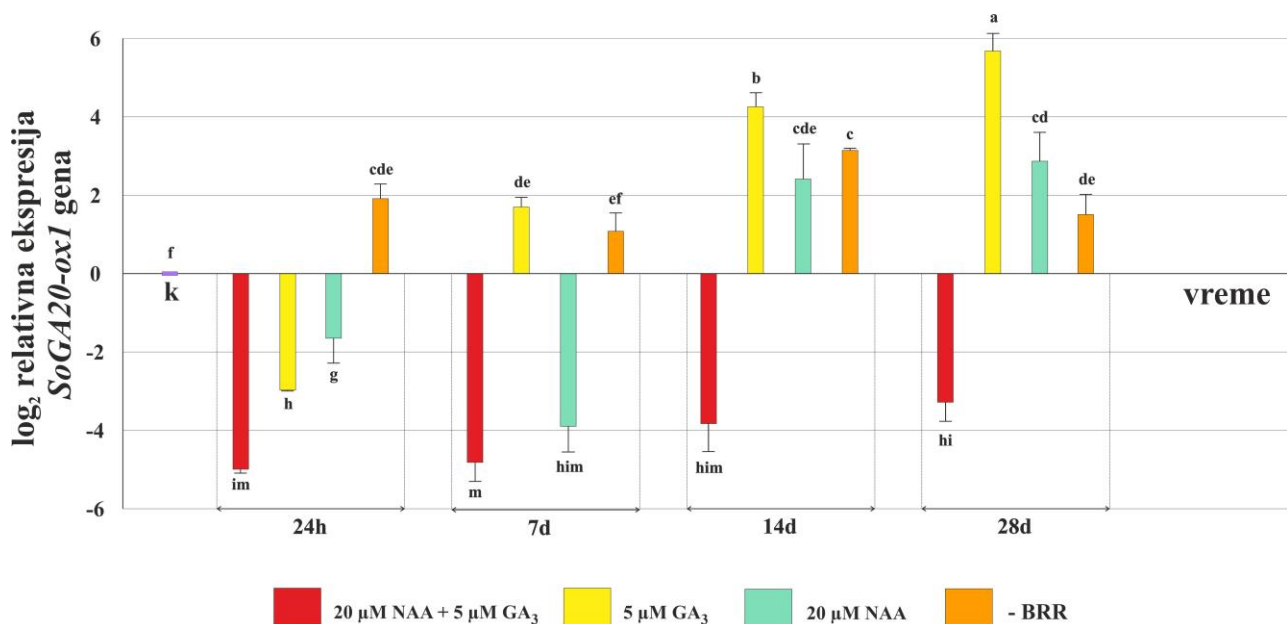
na 4h tokom 24h (počev od momenta izlaganja eksplantata svetlosti), kao i posle 72h, 7, 14, 21 i 28 dana. Pošto nije bilo značajnih razlika u ekspresiji ovih gena tokom prva 72h, u daljem radu analiza je vršena posle 1, 7, 14 i 28 dana.



Slika 24. Eksplantati korenova kultivisani na medijumu koji je sadržao (a,b) 20 μM NAA, (c, d) 20 μM NAA + 5 μM GA₃, (e) 5 μM GA₃ ili (f) bez BRR tokom 8 nedelja. Bar: a, c, e, f = 1 cm, b, d = 1 mm.

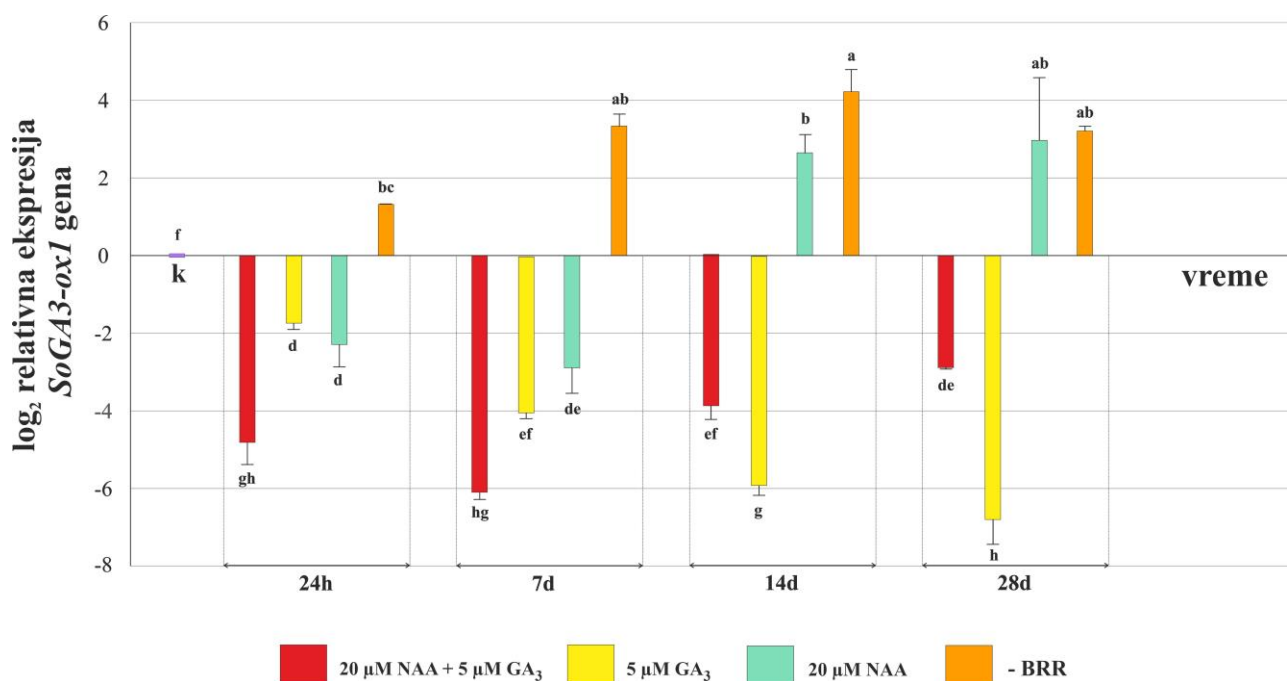
U kontrolnim eksplantatima, koji su paralelno postavljeni za klasičnu kvantifikaciju embriogenog potencijala eksplantata korišćenjem genetički identičnog biljnog materijala, do proliferacije ćelija korena i formiranja SE nije došlo na eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR i medijumu koji je sadržao 5 μM GA₃ uprkos tome što je analiza izvršena na velikom uzorku (120 jedinki, sa po 15-20 eksplantata) tokom 12 nedelja kultivacije (Sl. 24 e, f). Eksplantati kultivisani na medijumu sa 20 μM NAA su proliferisali u značajnoj meri, ali su regenerisali SE sa vrlo niskom frekvencijom regeneracije ($0.42 \pm 0.42\%$) i prosečnim brojem SE (0.003 ± 0.001 , Sl. 23a,b), dok je najveća frekvencija regeneracije ($82.48 \pm 1.14\%$) i prosečan broj SE (8.78 ± 0.05) dobijen na eksplantatima kultivisanim na IMSE (Sl. 24c,d).

Ekspresija *SoGA20-ox1* u eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR je već posle 24h bila veća u odnosu na kontrolu, eksplantate koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zamrznuti u tečnom azotu (Sl. 25). Tokom celokupnog perioda od 4 nedelje ekspresija ovog gena je bila na sličnom nivou. U eksplantatima kultivisanim na medijumu koji je sadržao 5 μM GA₃, ekspresija je najpre bila statistički značajno niža u odnosu na kontrolu 24 h nakon izolacije eksplantata, da bi posle 7 dana bila statistički značajno veća od kontrole (Sl. 25). Ovaj trend porasta ekspresije ovog gena se nastavio i posle 14 i 28 dana. Slično tome, u eksplantatima kultivisanim na medijumu koji je sadržao 20 μM NAA, ekspresija *GA20-ox1* je bila statistički značajno niža u odnosu na kontrolu, da bi posle 14 i 28 dana bila značajno veća od kontrole (Sl. 25). Konačno, u eksplantatima kultivisanim na IMSE, ekspresija *SoGA20-ox1* je tokom celokupnog perioda od 28 dana bila statistički značajno niža u odnosu na kontrolu (Sl. 25).



Slika 25. Ekspresija *SoGA20-ox1* u apikalnim odsečcima korenova kultivisanim tokom 1, 7, 14 ili 28 dana na IMSE (20 μM NAA + 5 μM GA₃), medijumu bez BRR ili na medijumu koji je sadržao 5 μM GA₃ ili 20 μM NAA. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin upotrebom $\Delta\Delta\text{C}_t$ metoda. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu.

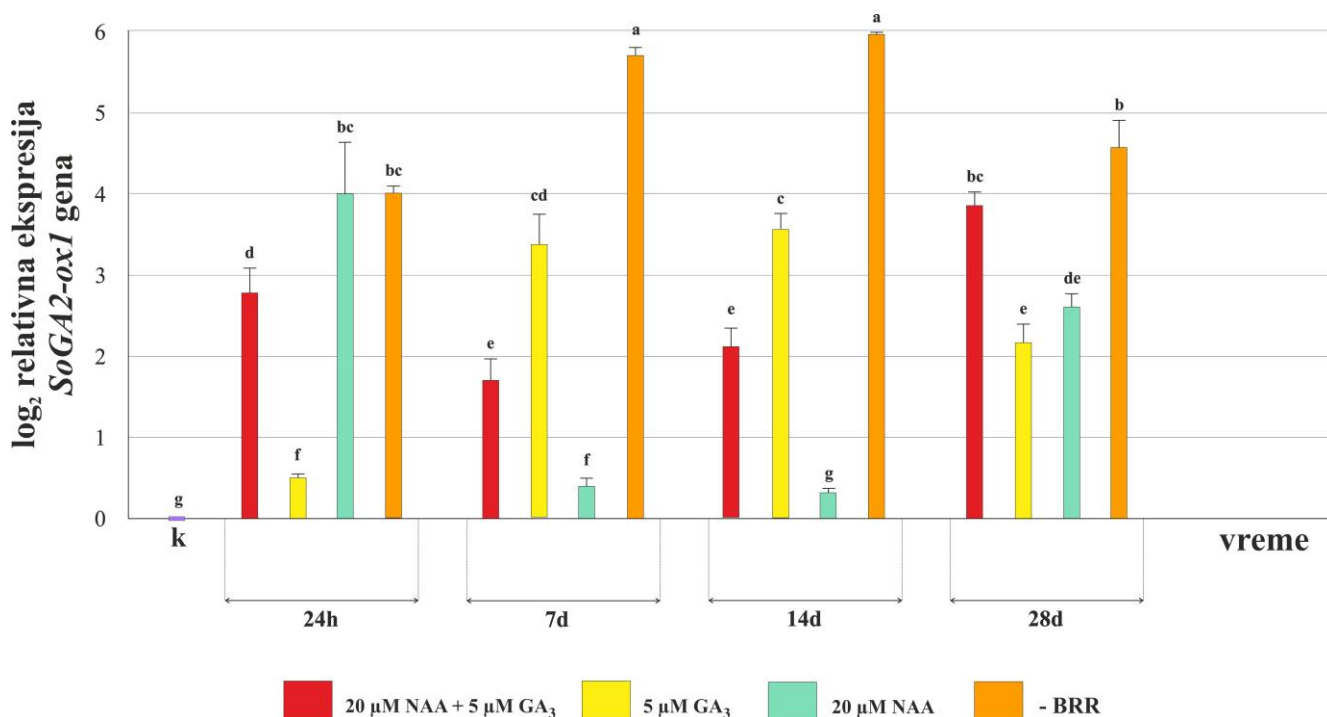
Ekspresija *SoGA3-ox1* je u eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR bila već posle 24 h, kao i tokom celokupnog eksperimenta, statistički značajno veća u odnosu na kontrolu (Sl. 26). Ekspresija ovog gena je u eksplantatima kultivisanim na medijumu koji je sadržao 20 μM NAA bila značajno niža od kontrole tokom prvih 7 dana, da bi zatim posle 14 i 28 dana bila veća od kontrole (Sl. 26). U eksplantatima kultivisanim na IMSE ili na medijumu koji je sadržao 5 μM GA₃, ekspresija *SoGA3-ox1* je bila tokom celog eksperimenta statistički značajno niža od kontrole (Sl. 26). Međutim, kod ove dve grupe uzoraka nivo ekspresije *SoGA3-ox1* se razlikovao. Dok je u eksplantatima kultivisanim na medijumu koji je sadržao 5 μM GA₃ nivo ekspresije *SoGA3-ox1* značajno padao iz nedelje u nedelju, u eksplantatima kultivisanim na IMSE nivo ekspresije *SoGA3-ox1* je najpre padao i bio niži nego u prethodnoj grupi eksplantata, da bi zatim posle 14 i 28d pad ekspresije bio značajno manji nego u prethodnoj grupi (Sl. 26).



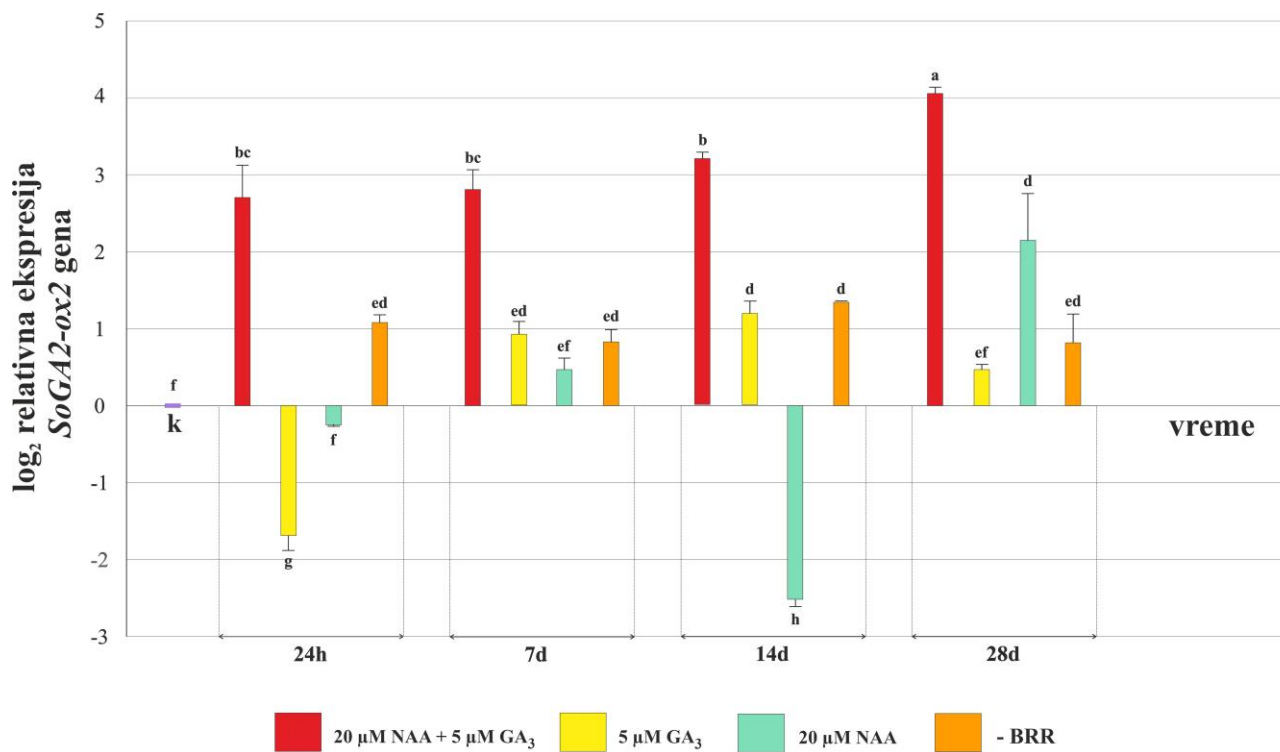
Slika 26. Ekspresija *SoGA3-ox1* u apikalnim odseccima korenova kultivisanim tokom 1, 7, 14 ili 28 dana na IMSE (20 μM NAA + 5 μM GA₃), medijumu bez BRR ili na medijumu koji je sadržao 5 μM GA₃ ili 20 μM NAA.. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin upotrebom $\Delta\Delta\text{C}_t$ metoda. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu.

Što se tiče gena uključenih u katabolizam GA, *GA2ox* gena, ekspresija sva tri klonirana gena kod spanaća (*SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3*) je detektovana tokom indukcije somatske embriogeneze, s tim što su se njihovi profili ekspresije značajno razlikovali na različitim tretmanima (Sl. 27-29). U eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR, ekspresija *SoGA2-ox1* se povećala oko 60 puta, dok se ekspresija *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3* neznatno povećala u poređenju sa kontrolom (Sl. 27-29). Eksplanati kultivisani na medijumu sa 20 μM NAA i na medijumu sa 5 μM GA₃ su imali slične profile ekspresije *SoGA2-ox1* i *SoGA2-ox2*. U eksplantatima izloženim pomenutim tretmanima, ekspresija *SoGA2-ox1* se statistički značajno povećala, dok je ekspresija *SoGA2-ox2* bila blago povećana u poređenju sa kontrolom (Sl. 27,28). Suprotno tome, profil ekspresije *SoGA2-ox3* se

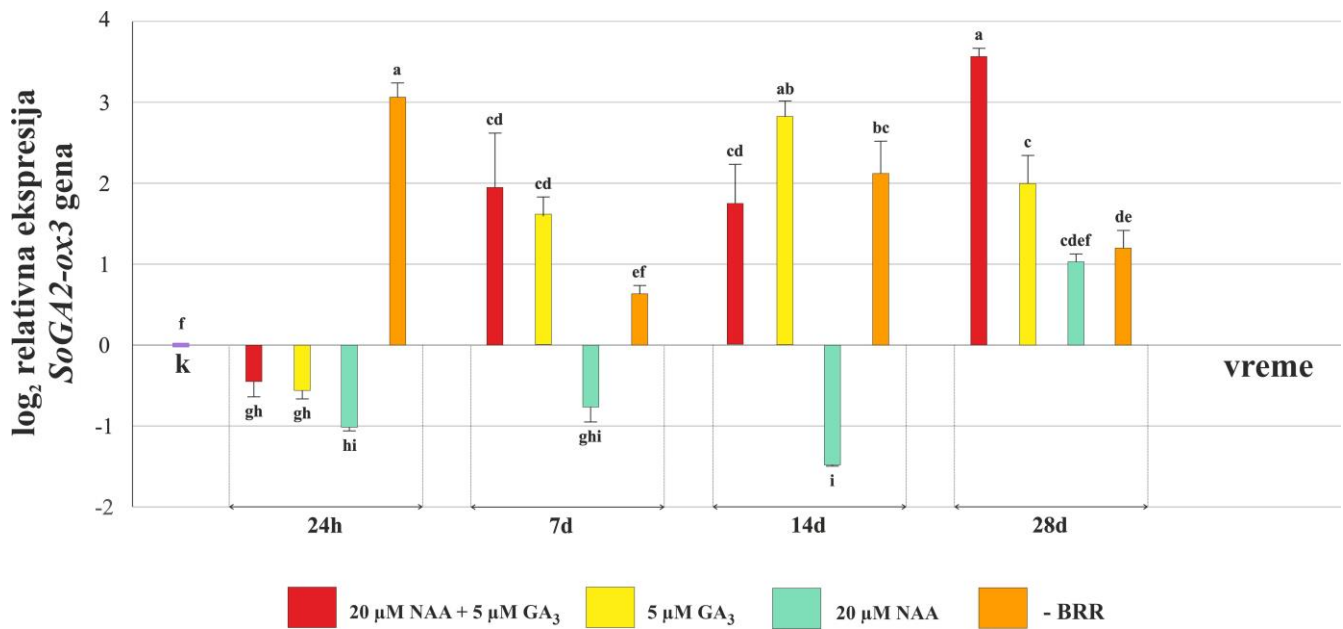
razlikovao. Ekspresija *SoGA2-ox3* je bila manja u eksplantatima kultivisanim na medijumu sa 20 μM NAA, dok u eksplantatima kultivisanim na medijumu sa 5 μM GA₃ ekspresija ovog gena je bila statistički značajno veća u poređenju sa kontrolom (Sl. 29). Eksplantati kultivisani na IMSE su pokazali značajan porast (oko 17 puta) u ekspresiji *SoGA2-ox1* i *SoGA2-ox2*, dok je ekspresija *SoGA2-ox3* bila slična kao u eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR (Sl. 27-29). Iako su profili ekspresije *SoGA2-ox1* i *SoGA2-ox2* bili veoma slični u eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR i IMSE, njihovi nivoi ekspresije su se značajno razlikovali. Ekspresija *SoGA2-ox1* se značajno povećala (oko 60 puta) u eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR u poređenju sa onim koji su bili kultivisani na IMSE, gde se ekspresija ovog gena povećala samo 17 puta. Sa druge strane, značajno veća ekspresija *SoGA2-ox2* (oko 17 puta) je detektovana u eksplantatima kultivisanim na IMSE u poređenju sa znatno manjim povećanjem ekspresije (oko 2.5 puta) ovog gena u eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR (Sl. 27,28).



Slika 27. Ekspresija *SoGA2-ox1* u apikalnim odseccima korenova kultivisanim tokom 1, 7, 14 ili 28 dana na IMSE (20 μM NAA + 5 μM GA₃), medijumu bez BRR ili na medijumu koji je sadržao 5 μM GA₃ ili 20 μM NAA. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin upotrebom $\Delta\Delta\text{C}_t$ metoda. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu.



Slika 28. Ekspresija *SoGA2-ox2* u apikalnim odseccima korenova kultivisanim tokom 1, 7, 14 ili 28 dana na IMSE (20 μ M NAA + 5 μ M GA₃), medijumu bez BRR ili na medijumu koji je sadržao 5 μ M GA₃ ili 20 μ M NAA. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin upotrebom $\Delta\Delta C_t$ metoda. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu.



Slika 29. Ekspresija *SoGA2-ox3* u apikalnim odseccima korenova kultivisanim tokom 1, 7, 14 ili 28 dana na IMSE (20 μM NAA + 5 μM GA₃), medijumu bez BRR ili na medijumu koji je sadržao 5 μM GA₃ ili 20 μM NAA. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α-tubulin upotrebom ΔΔC_t metoda. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite (p≤0.05) prema LSD testu.

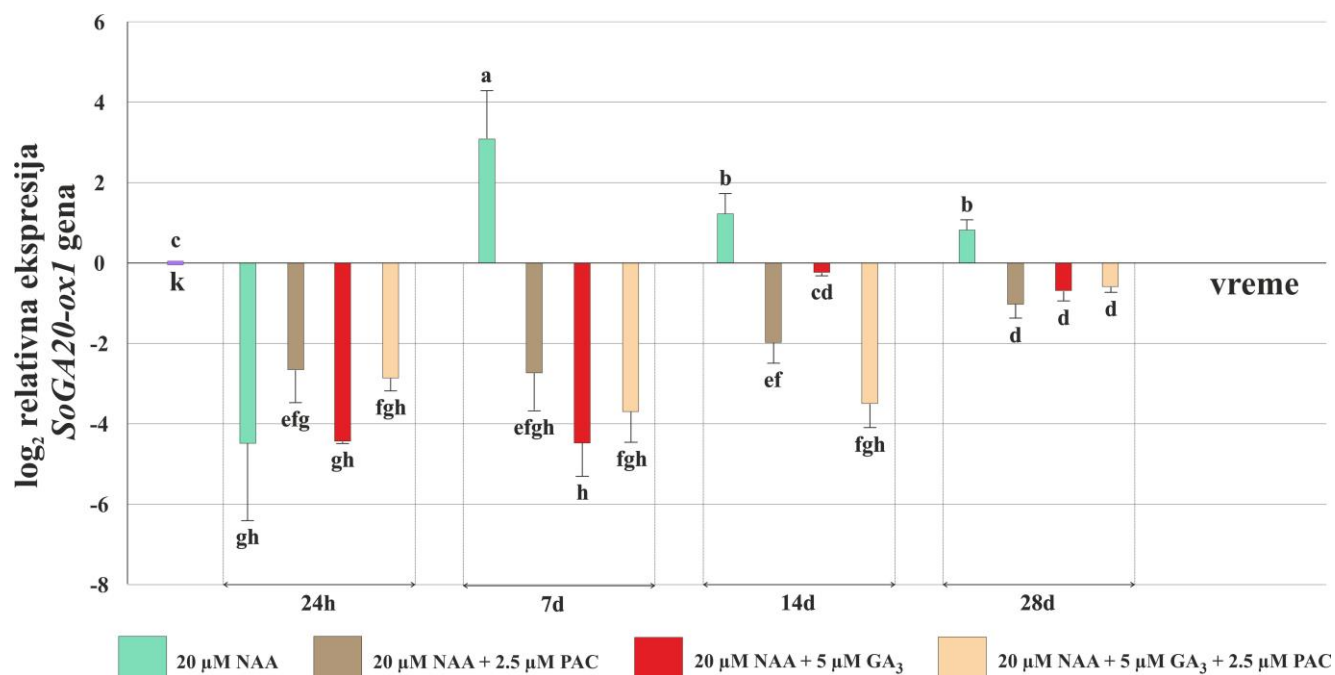
4.4. Uticaj paklobutrazola na ekspresiju gena za metabolizam giberelina u izolovanim odseccima korenova spanaća

Kako bi se ispitao mehanizam kojim PAC stimuliše somatsku embriogenezu kod spanaća, testirano je kako prisustvo ili odustvo 2.5 μM PAC u IMSE (NAA+GA₃) ili u medijumu koji sadrži NAA kao jedini BRR utiče na ekspresiju gena koji kodiraju ključne enzime za biosintezu i inaktivaciju GA tokom 24h, 7, 14 ili 28 dana.

Klasična kvantifikacija embriogenog potencijala eksplantata korišćenjem genetički identičnog biljnog materijala je pokazala da do formiranja SE nije došlo samo na eksplantatima kultivisanim na medijumu sa 20 μM NAA tokom 12 nedelja. Najveća frekvencija regeneracije (81.79% ± 6.3) i prosečni broj SE po eksplantatu (13.06 ± 7.53) je dobijen na eksplantatima kultivisanim na IMSE + 2.5 μM PAC. Značajno niži embriogeni potencijal su imali eksplantati kultivisani na IMSE (77.30% ± 6.08, 6.93 ± 1.93 SE) i 20 μM NAA + 2.5 μM PAC (62.53%, ± 9.2, 3.95 ± 1.45 SE). Dakle opadajući embriogeni potencijal su imali eksplantati kultivisani na: IMSE+PAC > IMSE > NAA+PAC > NAA.

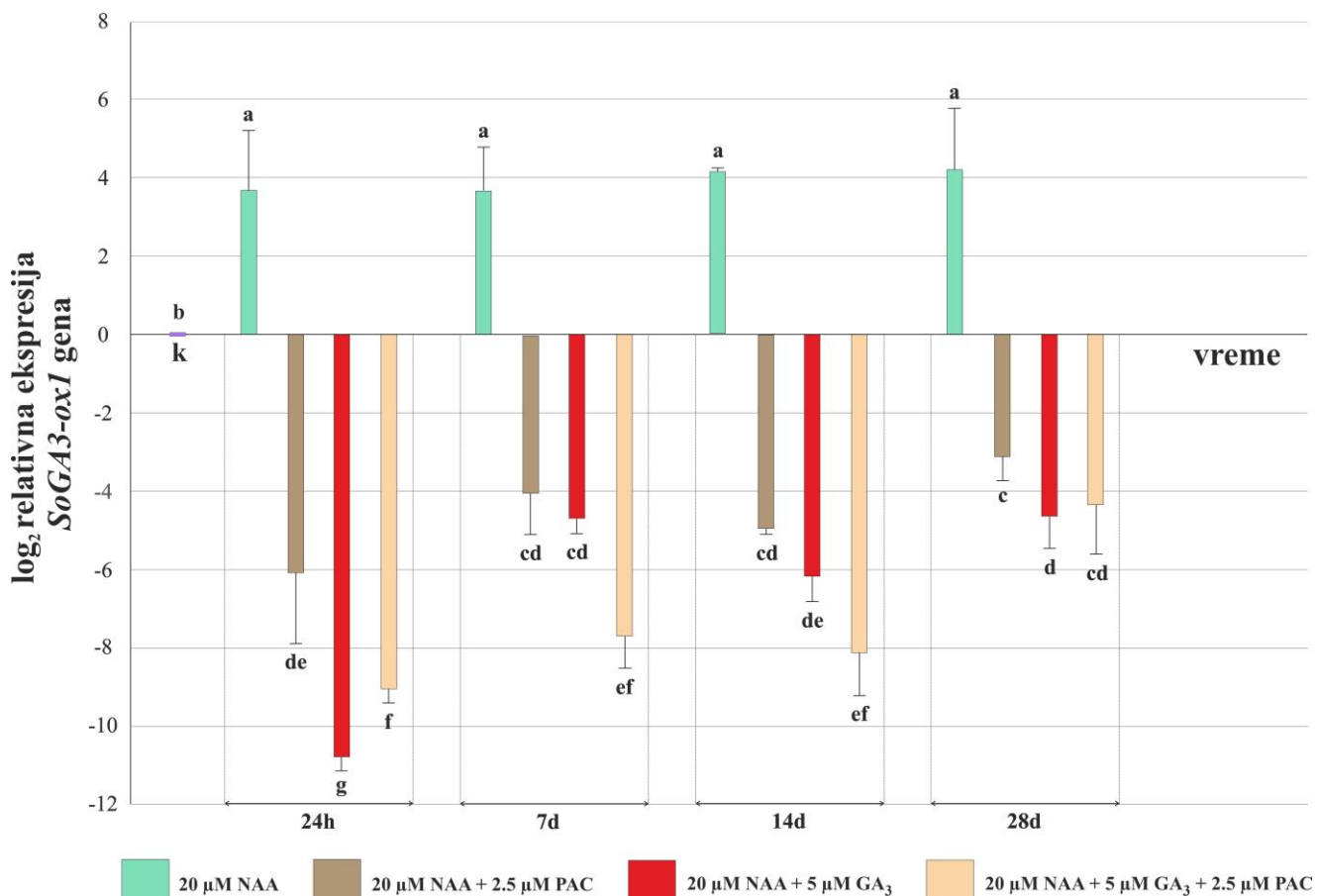
Trend ekspresije *SoGA20ox-1* u eksplantatima kultivisanim na medijumu sa 20 μM NAA ili na IMSE je bio isti kao u prethodnom eksperimentu; u eksplantatima kultivisanim na medijumu sa 20 μM NAA počev od 7. dana pa do kraja eksperimenta ekspresija ovog gena je bila značajno veća nego u kontrolnim eksplantatima, dok je u eksplantatima kultivisanim na IMSE detektovan konstantan pad njegove ekspresije tokom čitavog trajanja eksperimenta (Sl. 30). U eksplantatima kultivisanim na medijumu PAC+IMSE i PAC+NAA je takođe došlo do smanjenja ekspresije ovog gena koje je bilo veće na početku eksperimenta nego nakon 28 dana, ali je uvek bilo statistički značajno manje i različito u poređenju sa kontrolom, ali i u odnosu na eksplantate koji su kultivisani na medijumu sa

NAA (Sl. 30). Ekspresija *SoGA20-ox1* se nije statistički značajno razlikovala u eksplantatima kultivisanim na IMSE, IMSE+PAC i NAA+PAC, mada je uočen trend statistički značajnog povećanja ekspresije posle 28 dana tretmana u odnosu na prethodne vremenske tačke (Sl. 30).



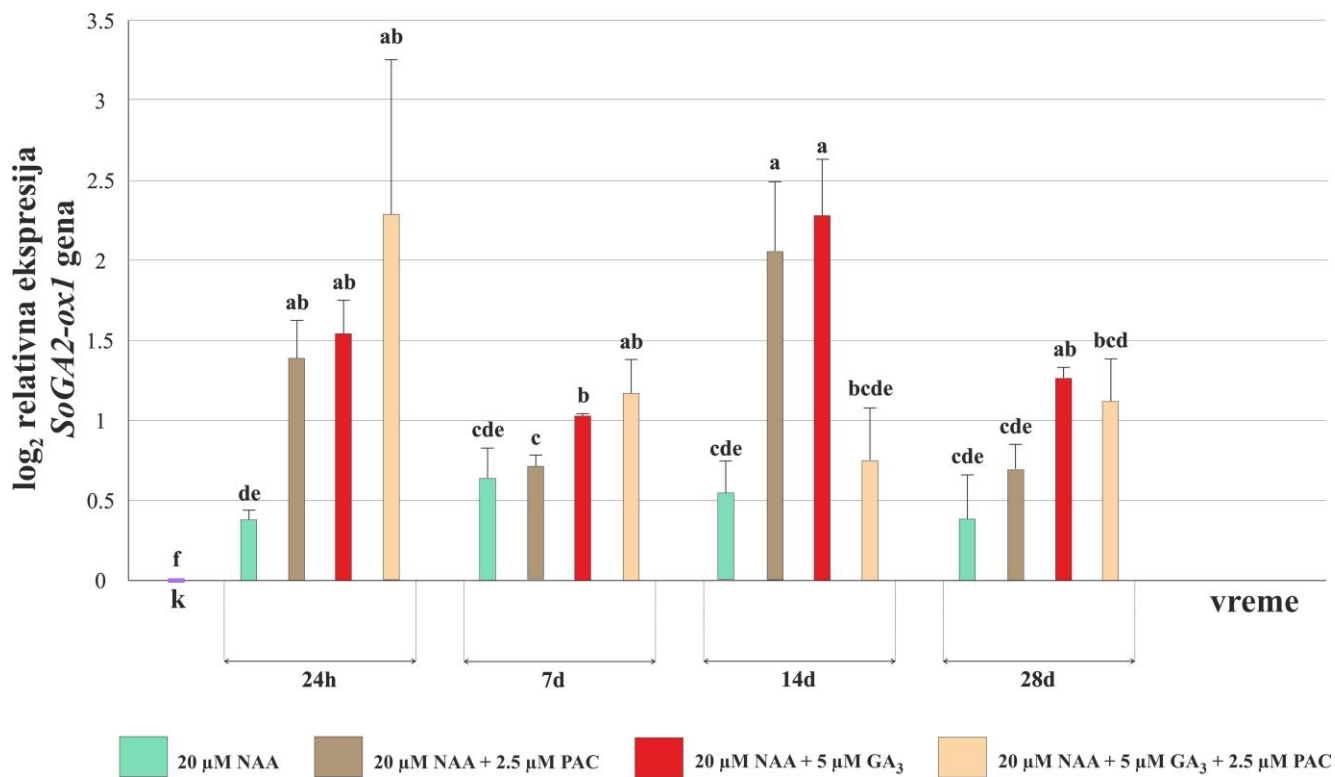
Slika 30. Ekspresija *SoGA20-ox1* u apikalnim odseccima korenova gajenim na BM sa 20 μM NAA + 2.5 μM PAC u kombinaciji sa 0 ili 5 μM GA₃ tokom 24h, 7, 14 ili 28 dana. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α-tubulin. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu.

Ekspresija *SoGA3-ox1* je bila povećana tokom čitavog trajanja eksperimenta u eksplantatima kultivisanim na medijumu koji je sadržao NAA i statistički se značajno razlikovala u poređenju sa kontrolom, dok je prisustvo GA₃ u IMSE izazvalo konstantno smanjenje u ekspresiji ovog gena tokom celokupnog perioda kultivacije od 4 nedelje (Sl. 31). Očekivano, dodavanje PAC u IMSE ili u medijum koji je sadržao NAA je izazvalo isti trend u ekspresiji ovog gena, kao i u slučaju ekspresije *SoGA20-ox1*. Smanjenje ekspresije *SoGA3-ox1* u eksplantatima kultivisanim na IMSE, NAA+PAC i IMSE+PAC je uvek bilo značajno manje u poređenju sa kontrolom, međutim nisu uočene statistički značajne razlike između navedenih tretmana tokom prvih 24 h trajanja eksperimenta, da bi nakon 7 i 14 dana, najveće smanjenje ekspresije *SoGA3-ox1* gena bilo detektovano u eksplantatima kultivisanim na IMSE+PAC koje se statistički značajno razlikovalo u poređenju sa svim ostalim testiranim tretmanima (Sl. 31). Ipak, na kraju eksperimenta nisu uočene statistički značajne razlike između tretmana, osim u sličaju eksplantata kultivisanih na medijumu koji je sadržao NAA (Sl. 31).

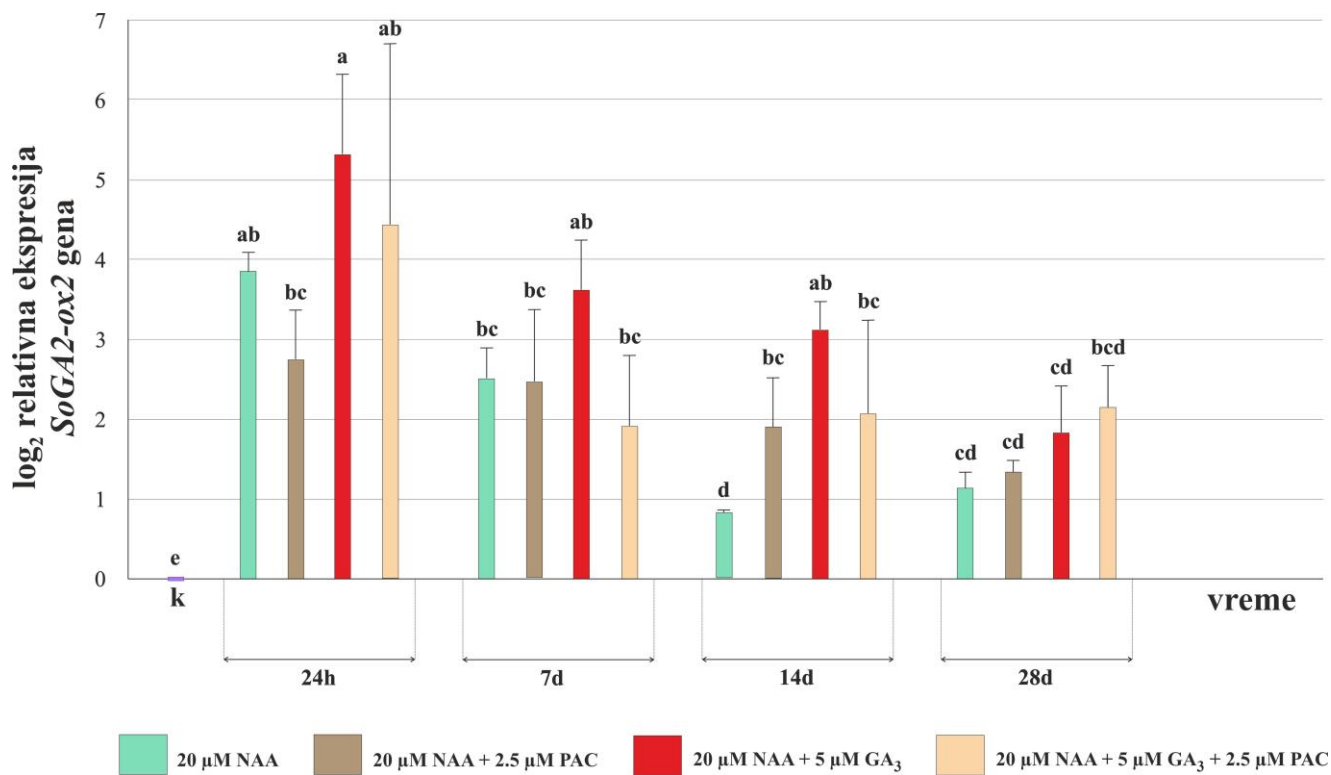


Slika 31. Ekspresija *SoGA3-ox1* u apikalnim odsečcima korenova gajenim na BM sa 20 μ M NAA + 2.5 μ M PAC u kombinaciji sa 0 ili 5 μ M GA₃ tokom 24h, 7, 14 ili 28 dana. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu

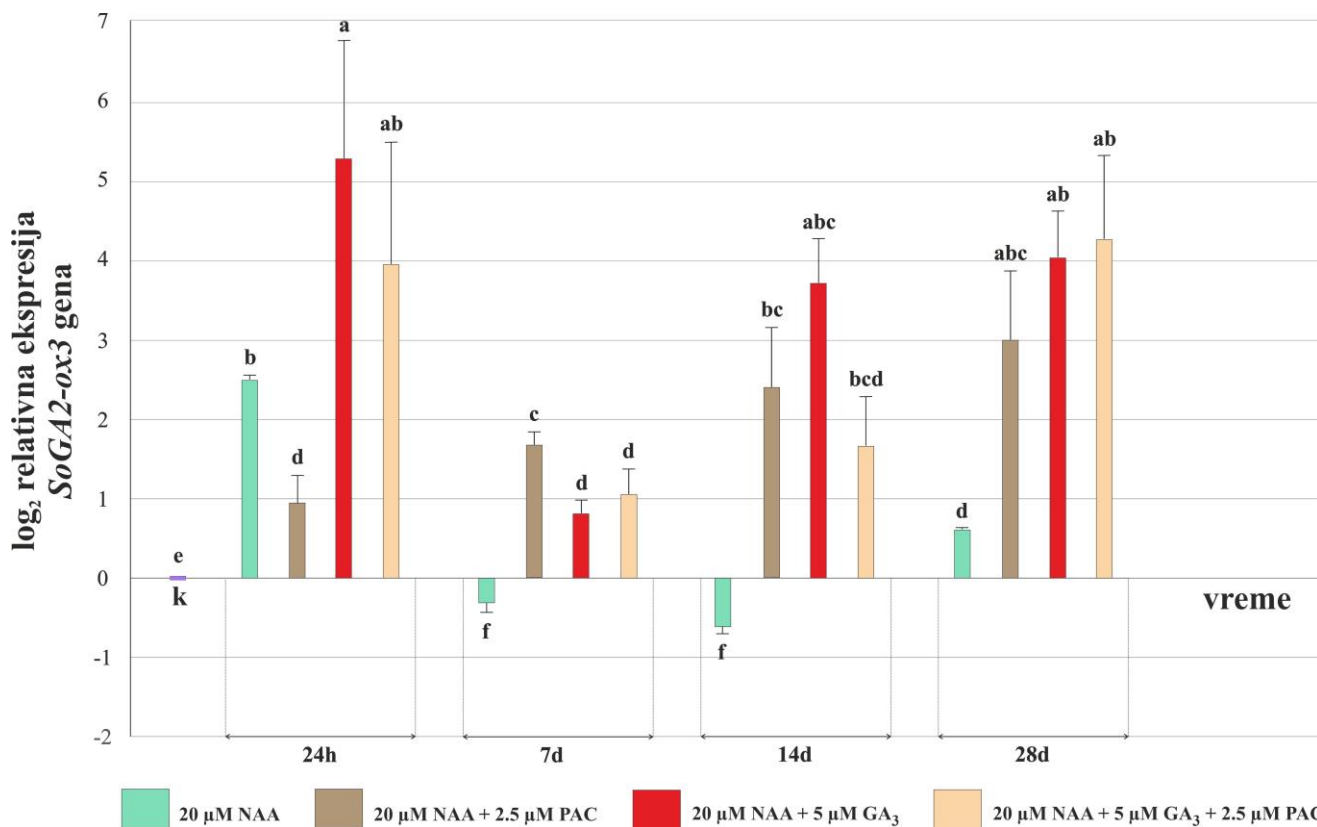
U eksplantatima kultivisanim na medijumu koji je sadržao NAA trend ekspresije sva tri *SoGA2-ox* gena je bio vrlo sličan trendu dobijenom u prethodnom eksperimentu (Sl. 26-28). U ovim eksplantatima je uočeno statistički značajno povećanje ekspresije *SoGA2-ox1* i *SoGA2-ox2* tokom celokupnog eksperimenta u poređenju sa kontrolom (Sl. 32, 33), dok se ekspresija *SoGA2-ox3* povećavala tokom prvih 24 h sata trajanja eksperimenta, da bi se nakon 7 i 14 dana smanjivala, a nakon 28 dana ponovo bila veća u odnosu na kontrolu (Sl. 34). Ekspresija sva tri *SoGA2-ox* gena je takođe bila značajno veća u eksplantatima gajenim na IMSE, NAA+PAC i IMSE+PAC u poređenju sa kontrolom, navedeno povećanje ekspresije ovih gena je u većini slučajeva bilo veće u ovoj grupi uzoraka nego u eksplantatima gajenim na medijumu sa NAA (Sl. 32-34).



Slika 32. Ekspresija *SoGA2-ox1* u apikalnim odsečcima korenova gajenim na BM sa 20 μM NAA + 2.5 μM PAC u kombinaciji sa 0 ili 5 μM GA₃ tokom 24h, 7, 14 ili 28 dana. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α-tubulin. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite (p<0.05) prema LSD testu.



Slika 33. Ekspresija *SoGA2-ox2* u apikalnim odsečcima korenova gajenim na BM sa 20 μM NAA + 2.5 μM PAC u kombinaciji sa 0 ili 5 μM GA₃ tokom 24h, 7, 14 ili 28 dana. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α-tubulin. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu

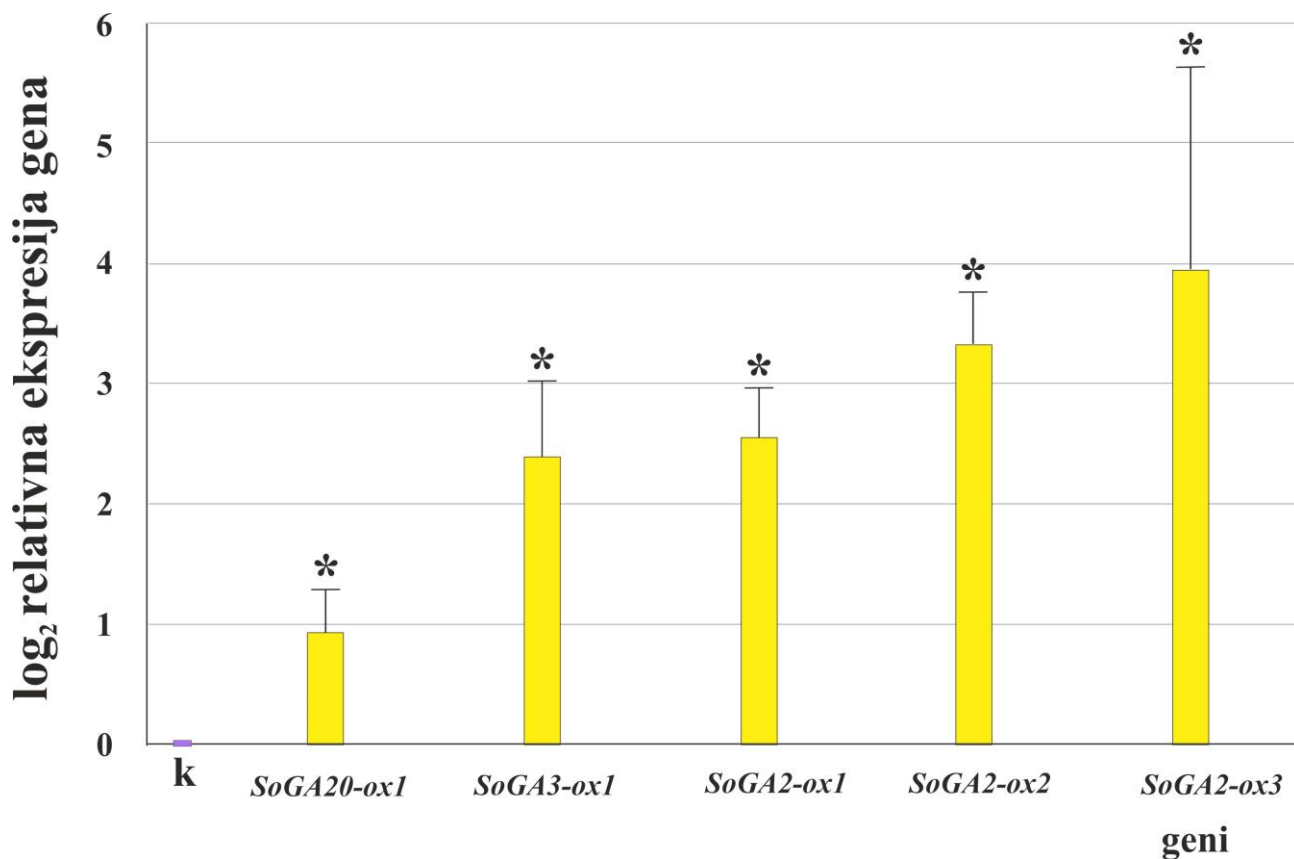


Slika 34. Ekspresija *SoGA2-ox3* u apikalnim odsečcima korenova gajenim na BM sa 20 μM NAA + 2.5 μM PAC u kombinaciji sa 0 ili 5 μM GA₃ tokom 24h, 7, 14 ili 28 dana. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α-tubulin. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu.

4.5. Uticaj svetlosti na ekspresija gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina u eksplantatima

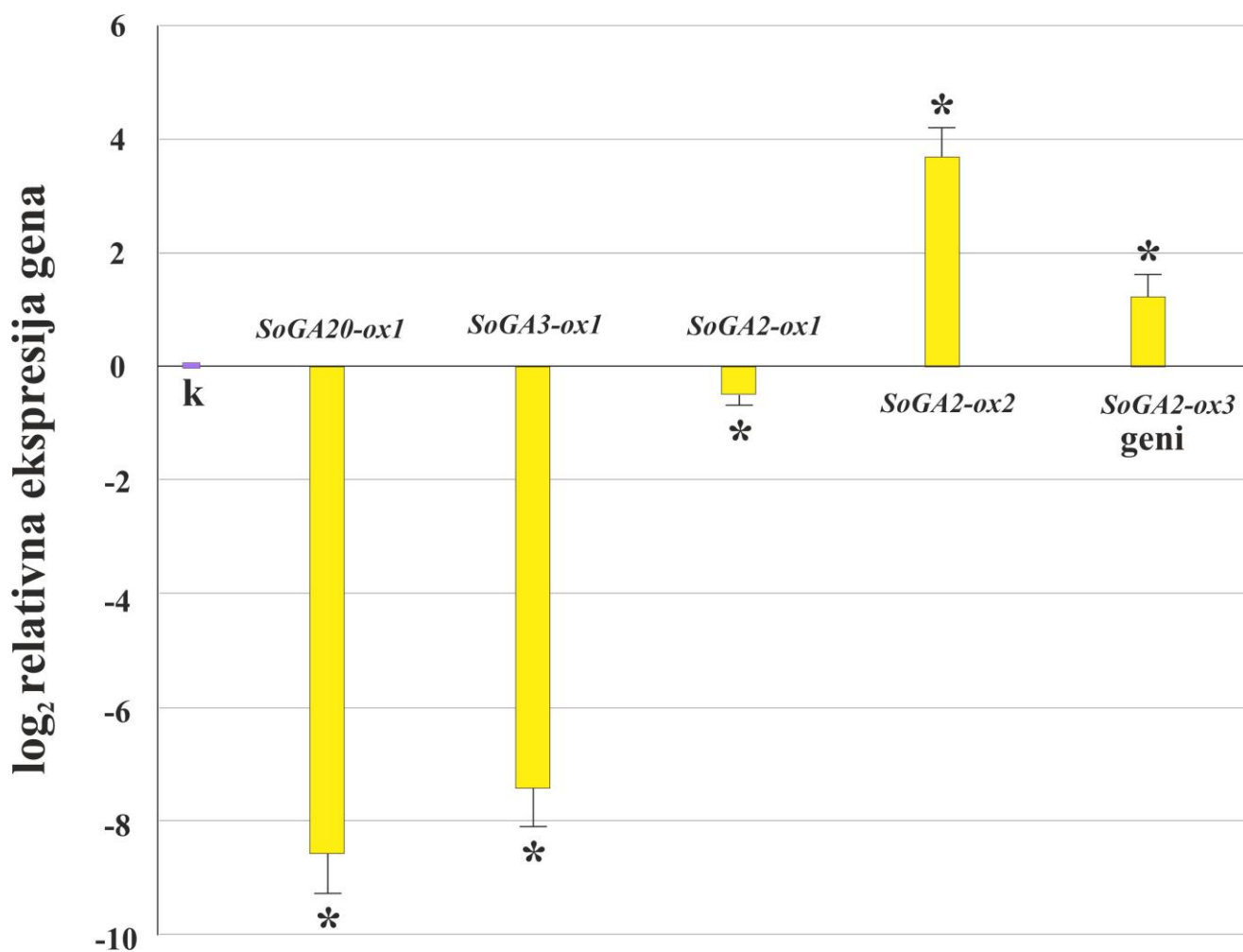
Da bi se utvrdio uticaj svetlosti u odsustvu GA₃ na ekspresiju *GA-ox* gena u izolovanim korenovima, analizirana je ekspresija ovih gena u eksplantatima posle 4 nedelje kultivacije na medijumu bez BRR, pod FL svetlošću i u uslovima DD ili u mraku. U eksplantatima kultivisanim u mraku detektovana je niska ekspresija svih pet gena, dok je u eksplantatima kultivisanim na svetlosti ekspresija *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox2*, *SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3* bila 2.03, 6.49, 6.37, 10.89, odnosno 33.4 puta veća u odnosu na eksplantate kultivisane u mraku (Sl. 35) (Belić *et al.*, 2020b).

Da bi se utvrdilo kako NAA+GA₃ i svetlost istovremeno utiču na ekspresiju *GA-ox* gena, ekspresija ovih gena je analizirana u eksplantatima kultivisanim na IMSE u odnosu na eksplantate kultivisane na medijumu bez BRR, oba pod FL svetlošću. Pod ovim uslovima u eksplantatima kultivisanim na IMSE detektovan je značajan pad ekspresije *SoGA20-ox1* (424.7 puta) i *SoGA3-ox1* (204.9 puta), dok je ekspresija *SoGA2-ox1* bila samo neznatno niža (1.4 puta), a ekspresija *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3* bila značajno veća (13.3, odnosno 4.85 puta) u odnosu na eksplantate kultivisane na medijumu bez BRR (Sl. 36) (Belić *et al.*, 2020b).



Slika 35. Ekspresija *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1*, *SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3* u apikalnim odseccima korenova kultivisanim na medijumu bez BRR pod FL svetlošću u uslovima DD. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin i određena relativno u odnosu na ekspresiju odgovarajućeg gena u eksplantatima kultivisanim u mraku pomoću $\Delta\Delta C_t$ metode. Dobijene vrednosti su podvrgnute \log_2 transformaciji i predstavljene kao relativne vrednosti. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema t testu za zavisne uzorke. Modifikovano prema Belić *et al.* (2020b).

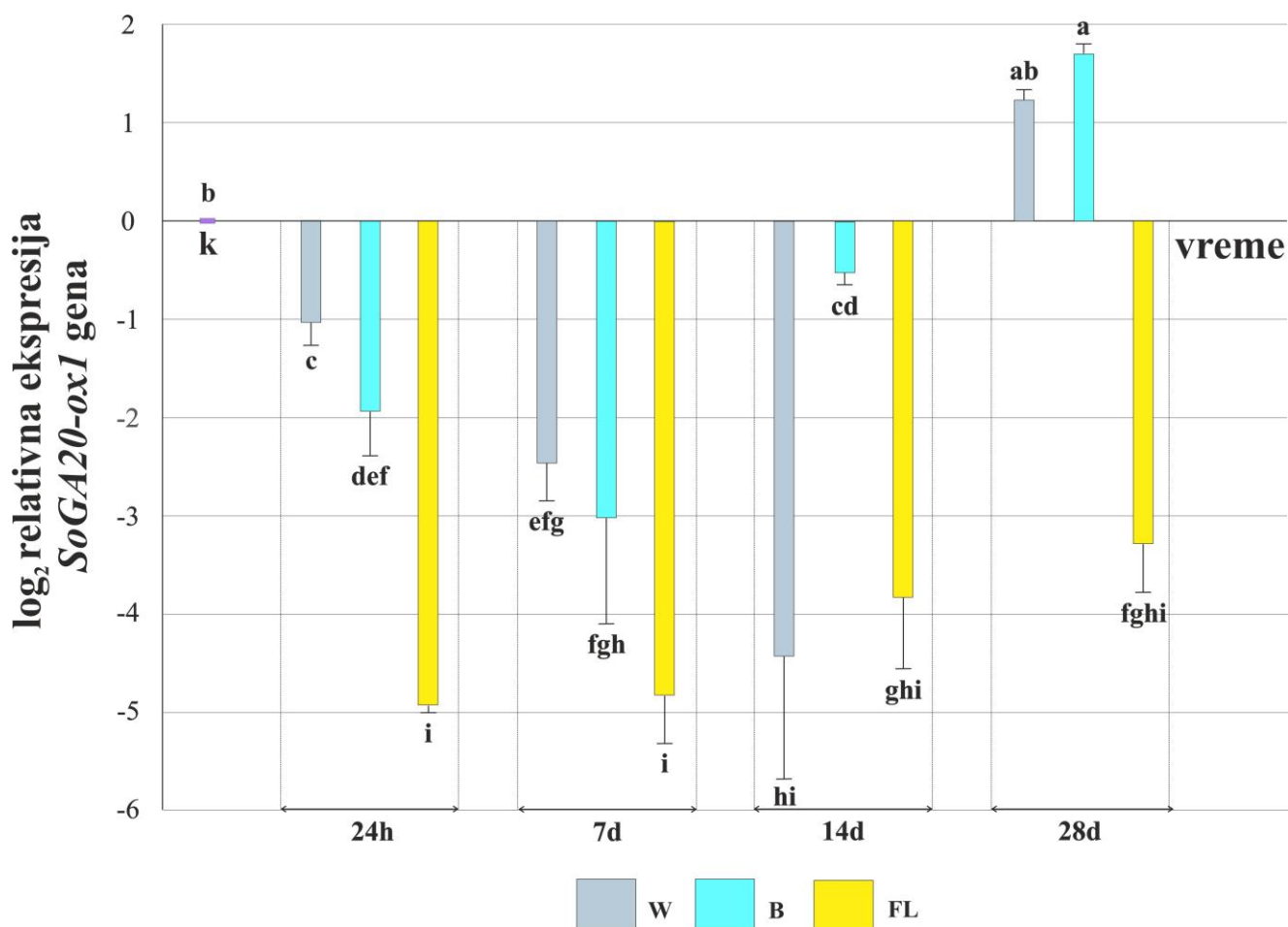
Da bi se testiralo da li svetlost deluje na indukciju SE utičući na metabolizam GA, analizirana je ekspresija *GA-ox* gena u eksplantatima kultivisanim na IMSE pod izabranim svetlosnim tretmanima. Prethodni rezultati ukazuju da se regeneracija SE dešava pod uticajem FL, B i W svetlosti, stoga je ekspresija *GA-ox* gena analizirana u eksplantatima kultivisanim pod ovim svetlosnim tretmanima.



Slika 36. Ekspresija *SoGA20-ox1*, *SoGA3-ox1*, *SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3* u apikalnim odsečcima korenova kultivisanim na IMSE pod FL svetlošću u uslovima DD. Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin i određena relativno u odnosu na ekspresiju odgovarajućeg gena u eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR pod istim uslovima osvetljenja pomoću $\Delta\Delta C_t$ metode. Dobijene vrednosti su podvrgnute \log_2 transformaciji i predstavljene kao relativne vrednosti. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema t testu za zavisne uzorke. Modifikovano prema Belić *et al.* (2020b).

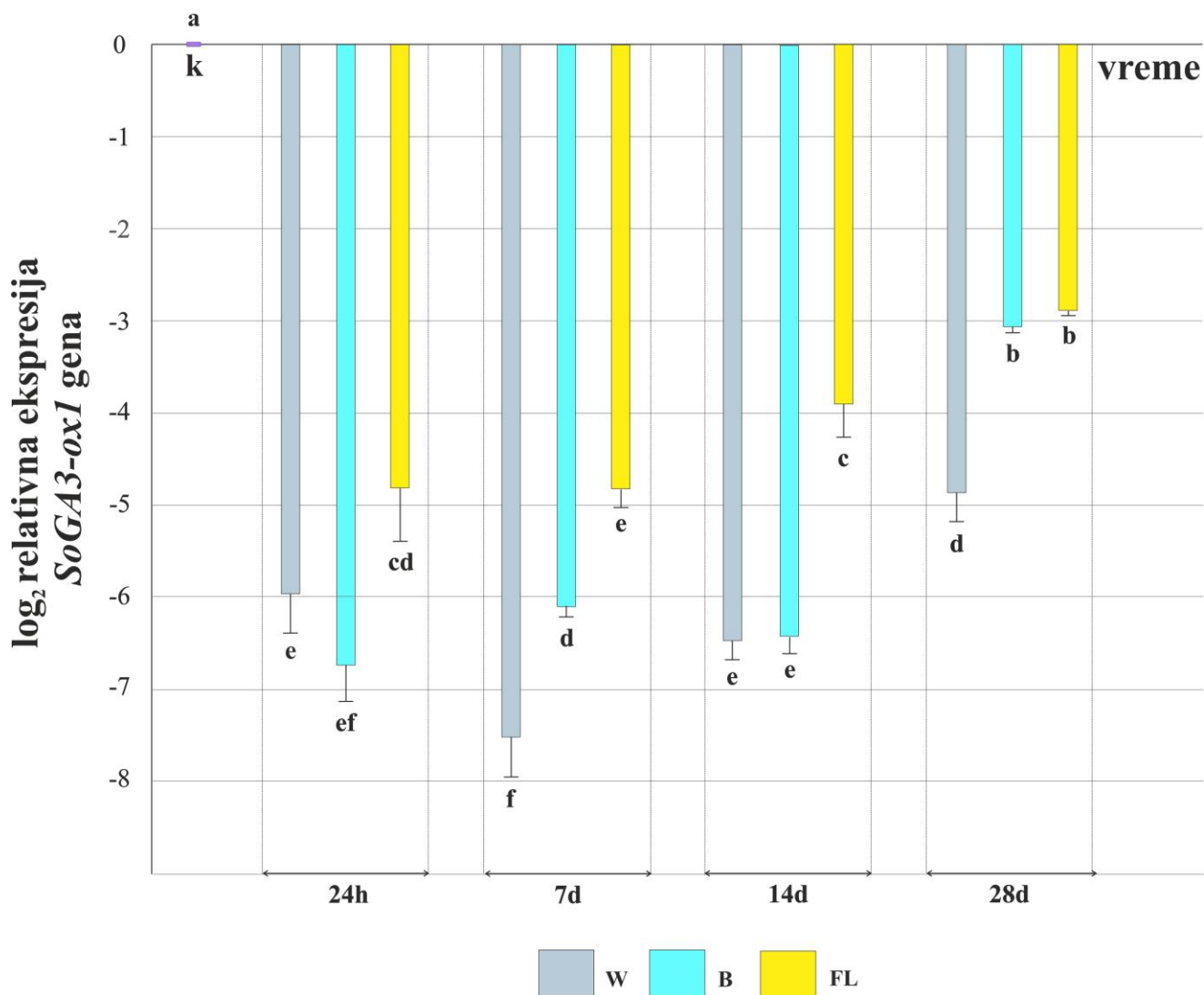
Paralelna *in vitro* kontrola urađena na genetički identičnom biljnom materijalu je pokazala da je $46.6\% \pm 0.03$ eksplantata kultivisanih na B svetlosti regenerisalo prosečno 2.89 ± 0.006 SE po eksplantatu, dok je na FL svetlosti regenerisalo $19.31\% \pm 0.55$ eksplantata sa prosečno 1.27 ± 0.06 SE po eksplantatu, a na W svetlosti je regenerisalo $5.64\% \pm 1.47$ eksplantata sa prosečno oko 0.21 ± 0.06 SE po eksplantatu.

Ekspresija *SoGA20-ox1* je u svim eksplantatima bila manja u odnosu na kontrolu, korenove intaktnih klijanaca, tokom 14 dana, da bi posle 28 dana bila detektovana značajno veća ekspresija ovog gena u eksplantatima kultivisanim pod B i W LED svetlošću, dok je u eksplantatima kultivisanim pod FL svetlošću ekspresija ovog gena bila i dalje značajno niža u odnosu na kontrolu (Sl. 37).



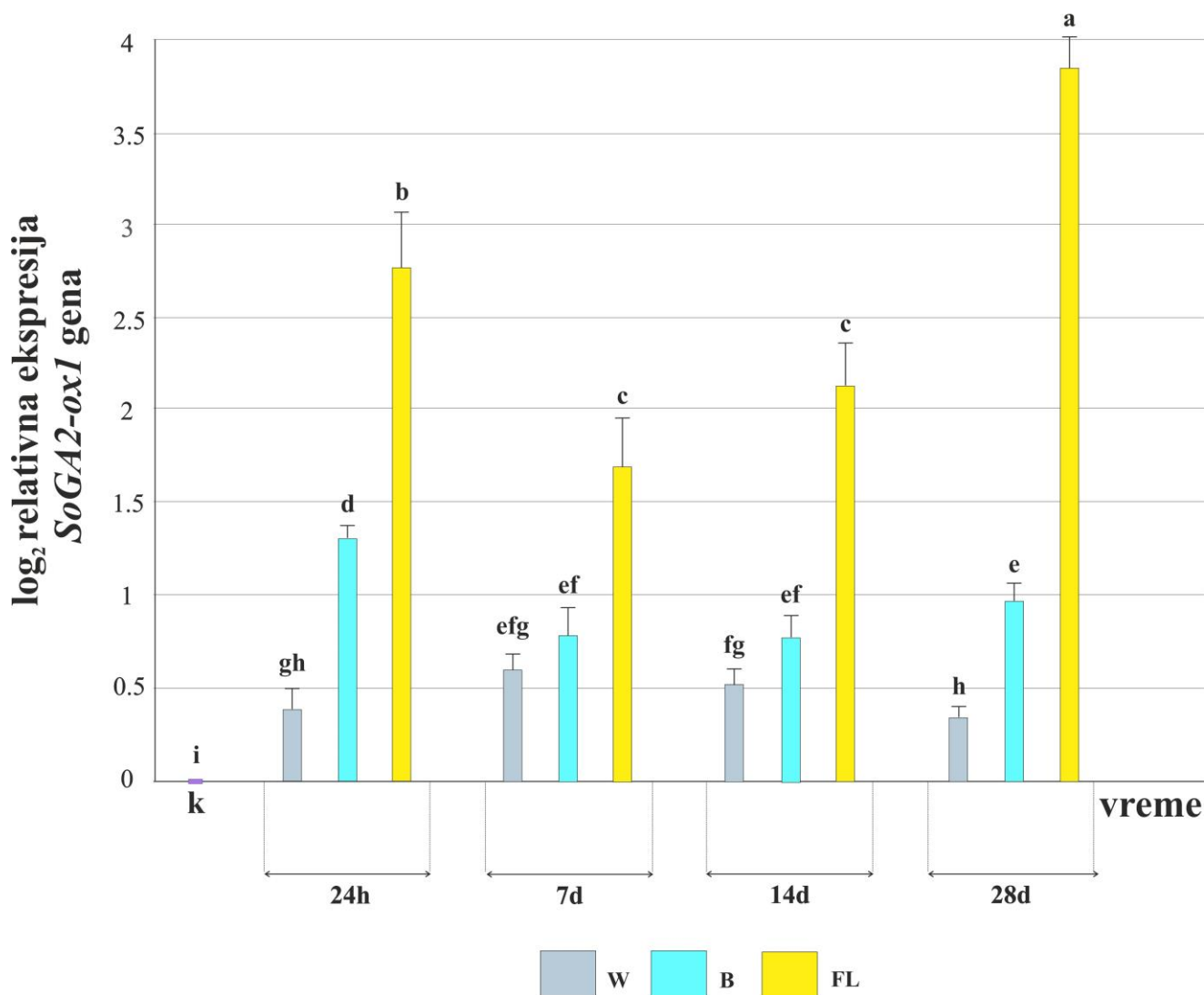
Slika 37. Ekspresija *SoGA20ox-1* u apikalnim odsečcima korenova kultivisanim na IMSE pod uticajem FL (380-680 nm, $17 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i LED osvetljenja iz oblasti B dela spektra (460 nm, $10.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i W spektra (300-720 nm, $16 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu

Ekspresija *SoGA3-ox1* je tokom celokupnog eksperimenta u svim eksplantatima bila značajno niža nego u kontroli (Sl. 38).



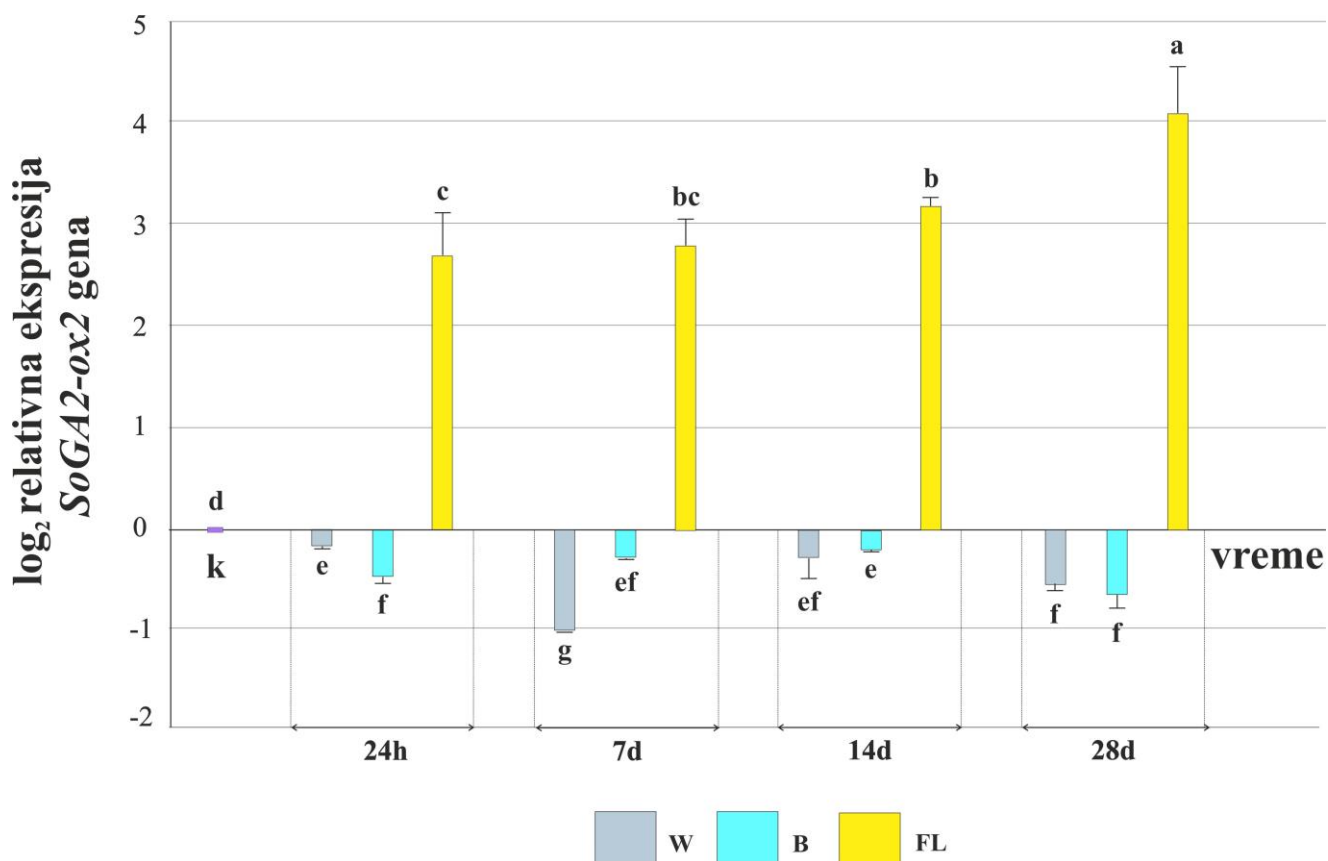
Slika 38. Ekspresija *SoGA3ox-1* u apikalnim odsečcima korenova gajenih na IMSE pod uticajem FL (380-680 nm, $17 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i LED osvetljenja iz oblasti B dela spektra (460 nm, $10.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i W spektra (300-720 nm, $16 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu.

Ekspresija *SoGA2-ox1* je u svim eksplantatima bila veća u odnosu na kontrolu, s tim što je u eksplantatima kultivisanim pod FL svetlošću bila veća nego u eksplantatima kultivisanim pod B i W LED svetlošću (Sl. 39).



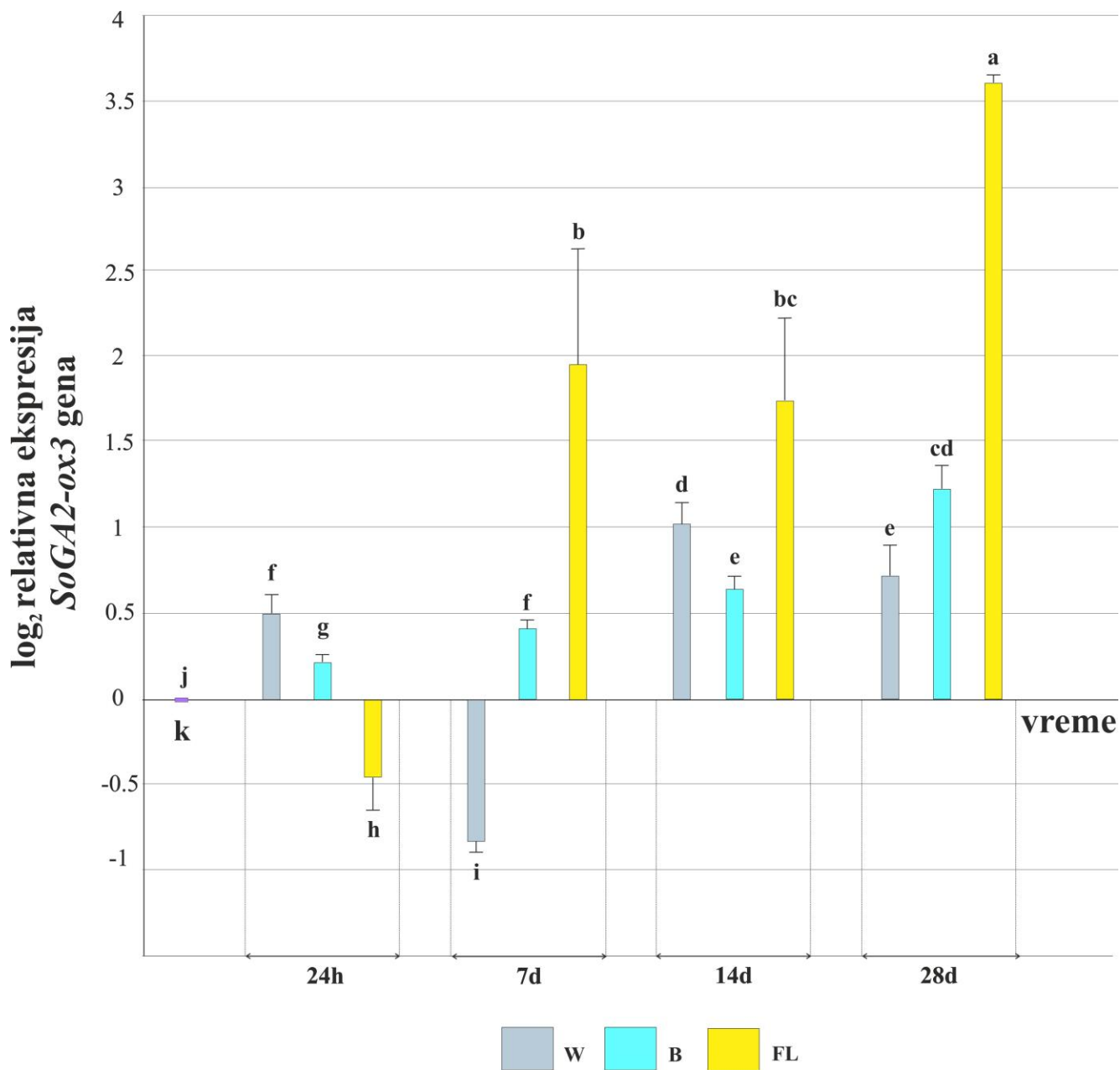
Slika 39. Ekspresija *SoGA2ox-1* u apikalnim odseccima korenova gajenim gajenih na IMSE pod uticajem FL (380-680 nm, $17 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i LED osvetljenja iz oblasti B dela spektra (460 nm, $10.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i W spektra (300-720 nm, $16 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu.

Najveće razlike između svetlosnih tretmana su uočene za ekspresiju *SoGA2-ox2* gena, koja je u eksplantatima kultivisanim pod FL svetlošću je bila značajno veća u odnosu na kontrolu, ali i eksplantate kultivisane pod B i W LED svetlošću, u kojima je ekspresija ovog gena bila niža ili približna kontroli (Sl. 40).



Slika 40. Ekspresija *SoGA2ox-2* u apikalnim odsečcima korenova gajenih na IMSE pod uticajem FL (380-680 nm, $17 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i LED osvetljenja iz oblasti B dela spektra (460 nm, $10.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i W spektra (300-720 nm, $16 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu.

Ekspresija *SoGA2-ox3* je, osim u par izuzetaka, bila veća od kontrole, najčešće veća u eksplantatima kultivisanim pod FL svetlošću nego u eksplantatima kultivisanim pod B i W LED svetlošću (Sl. 41). Rezultati dobijeni u ovom eksperimentu ukazuju da razlike u embriogenom potencijalu eksplantata kultivisanih pod osvetljenjem različitih opsega vidljivog spektra nisu nastale usled uticaja svetlosti na ekspresiju *GA-ox* gena.



Slika 41. Ekspresija *SoGA2ox-3* u apikalnim odsečcima korenova gajenim na IMSE pod uticajem FL (380-680 nm, $17 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i LED osvetljenja iz oblasti B dela spektra (460 nm, $10.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) i W spektra (300-720 nm, $16 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Ekspresija je normalizovana u odnosu na ekspresiju gena za α -tubulin. Kao kalibrator su korišćeni eksplantati koji su odmah po izolaciji sa klijanaca zaleđeni u tečnom azotu. Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardna greška tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite ($p \leq 0.05$) prema LSD testu.

4.6. Analiza endogenih giberelina

Analiza sadržaja prekursora (GA₉, GA₁₃, GA₁₅, GA₁₉, GA₂₀, GA₂₄, GA₄₄ i GA₅₃), bioaktivnih (GA₁, GA₃, GA₄, GA₅, GA₆ i GA₇) i neaktivnih metabolita GA (GA₈, GA₃₄, GA₂₉ i GA₅₁) u eksplantatima kultivisanim na IMSE i medijumu koji je sadržao NAA, kao i u kontrolnim eksplantatima, je pokazala prisustvo većine prekursora oba biosintetička puta (13-nehidroksilovanih i 13-hidroksilovanih) GA, koji se prevode iz zajedničkog prekursora GA₁₂ u bioaktivne GA. Od testiranih GA, prekursori puta 13-nehidroksilovanih GA, GA₂₄ i GA₉, nisu detektovani ni u jednom od testiranih uzoraka, kao ni bioaktivni GA₆ niti neaktivni metabolit GA₅₁.

U kontrolnim eksplantatima, koji su paralelno postavljeni za klasičnu kvantifikaciju embriogenog potencijala eksplantata korišćenjem genetički identičnog biljnog materijala, do formiranja SE je došlo samo na eksplantatima kultivisanim na IMSE. Frekvencija regeneracije ovih eksplantata je iznosila 94.8±5.2%, dok je prosečan broj SE po eksplantatu bio 19.21±2.73. Nijedan eksplantat koji je kultivisan na medijumu sa 20 µM NAA nije regenerisao SE tokom 12 nedelja kultivacije. Iz praktičnih razloga, u daljem tekstu eksplantati kultivisani na IMSE će biti označeni kao embriogeni, a eksplantati kultivisani na medijumu koji je sadržao NAA kao neembriogeni eksplantati.

U kontrolnim odsečcima korenova, koji nisu bili izloženi nijednom tretmanu, već su odmah po izolaciji sa klijanaca zamrznuti u tečnom azotu, detektovana je približna koncentracija GA₁₅ (0.31 pg/mg) i GA₅₃ (0.48 pg/mg), glavnih prekursora puta 13-nehidroksilovanih, odnosno 13-hidroksilovanih GA (Sl. 42a, 43a). U znatnoj manjoj količini su detektovani ostali prekursori iz puta 13-hidroksilovanih GA: GA₄₄ (0.05 pg/mg), GA₂₀ (0.06 pg/mg) i GA₁₉ (0.11 pg/mg), dok prekursori puta 13-nehidroksilovanih GA, GA₂₄ i GA₉, nisu uopšte detektovani u ovim uzorcima (Sl. 43b,c,d). U kontrolnim uzorcima je detektovano prisustvo svih bioaktivnih GA (GA₁, GA₃, GA₄, GA₅ i GA₇), osim GA₆, s tim da je detektovana najveća koncentracija GA₄ (0.27 pg/mg), koja je bila 3.6 puta veća nego GA₁ (Tabela 15), dok je koncentracija ostalih bioaktivnih GA bila niža za red veličine i kretala se u opsegu 0.02 - 0.06 pg/mg (Sl. 42d,e, 43e,i). Od produkata inaktivacije GA, nastalih delovanjem GA2-ox, nije detektovan GA₅₁, dok su koncentracije GA₂₉ i GA₈ bile približne, a koncentracija GA₃₄ je bila oko 11 puta manja (Tabela 15, Sl. 43f,g).

U embriogenim eksplantatima su uočene značajno veće promene u metabolizmu GA nego u neembriogenim eksplantatima. Iako se koncentracija svih prekursora povećala u oba tipa eksplantata, u neembriogenim eksplantatima je došlo samo do neznatnog povećanja koncentracije prekursora bioaktivnih GA u odnosu na kontrolu i to povećanje za GA₄₄, GA₁₉ i GA₂₀ je iznosilo 1.1-2.8 puta i nije se bitno menjalo tokom kultivacije, dok je u embriogenim eksplantatima detektovano značajno povećanje koncentracije ovih GA, koje je iznosilo 18.2, 7.4, odnosno 17 puta posle 24h, da bi posle 7 dana bilo niže ili isto (6, 7.4, odnosno 11 puta, Sl. 43b,c,d, Tabela 15). U neembriogenim eksplantatima najveće povećanje koncentracije je detektovano za GA₁₃ od 4.3 puta posle 24h kultivacije, ali se ovaj GA ne konvertuje u bioaktivne GA. U embriogenim eksplantatima, koncentracija GA₅₃, GA₁₅ i GA₁₃ je bila blago povećana, (1.3 puta, 2.2 puta, odnosno 3.3 puta) posle 24 h i ostala je na tom nivou i posle 7 dana (Sl. 42a, Sl. 43a,b, Tabela 15).

Najveće razlike u sadržaju endogenih GA između embriogenih i neembriogenih eksplantata su bile u sadržaju bioaktivnih GA. U embriogenim eksplantatima je detektovana najveća koncentracija GA₄ (13.2 pg/mg) i GA₇ (4.07 pg/mg) nakon 24h tretmana, da bi posle 7 dana došlo do smanjenja koncentracije GA₄ na 7.5 pg/mg i GA₇ na 1.72 pg/mg. Posle 24h sata koncentracija GA₄ je bila 60 puta, a koncentracija GA₇ 136 puta veća u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, u neembriogenim

eksplantatima koncentracije GA₄ i GA₇ su bile samo 1.3 odnosno 1.7 puta veće u poređenju sa kontrolom posle 24h i to se nije značajno promenilo ni posle 7 dana (Tabela 15, Sl. 42c,d).

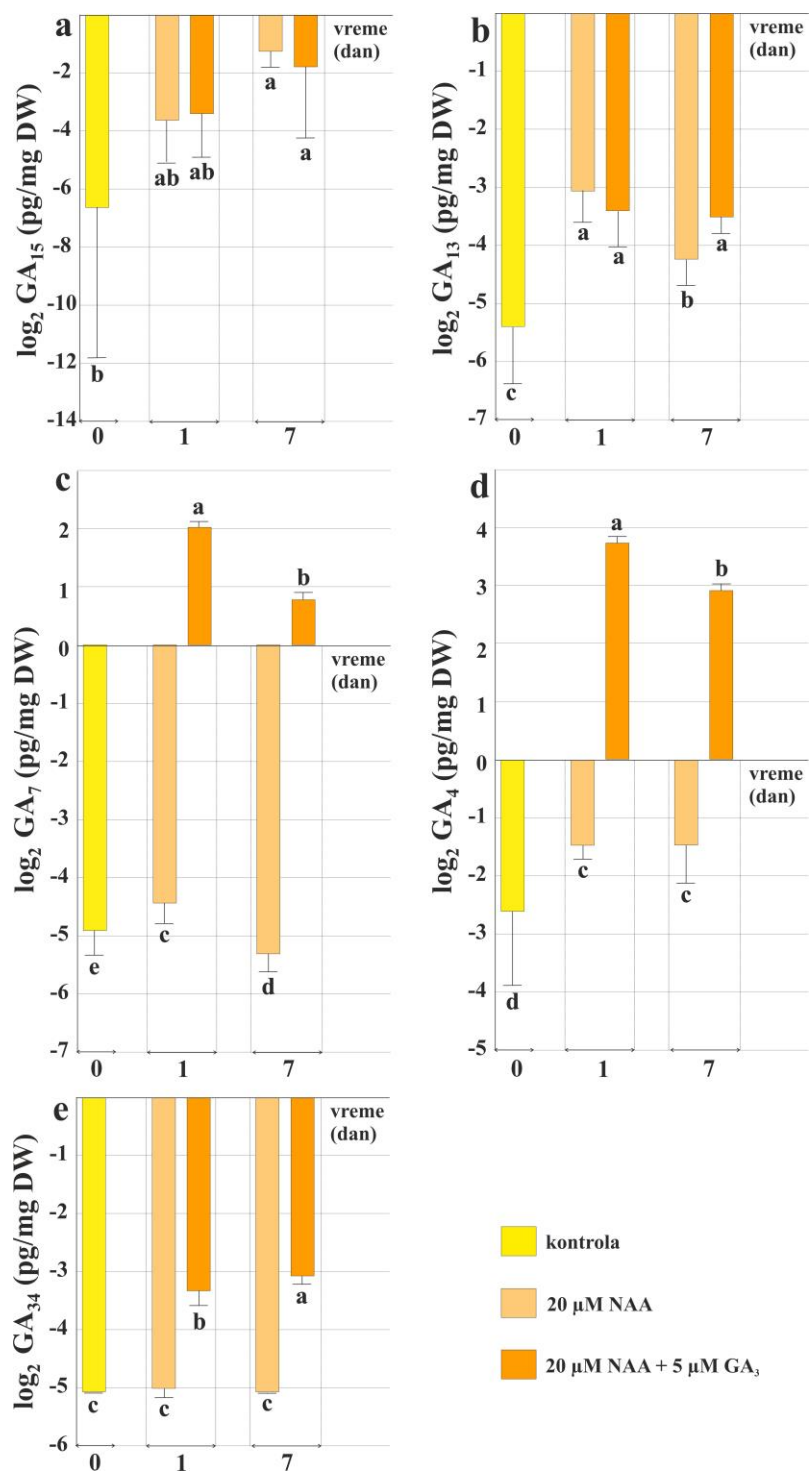
Sličan trend je uočen i u sadržaju GA₁ i GA₃. Pa tako, koncentracija GA₁ u embriogenim eksplantatima je nakon 24h sata bila 843 puta veća, a nakon 7 dana 1054 puta veća u odnosu na kontrolu (Tabela 15, Sl. 43e). Za razliku od toga, koncentracija GA₁ u neembriogenim eksplantatima je iznosila samo 0.08 pg/mg nakon 24h i 0.03 pg/mg nakon 7 dana, slično količini ovog GA u kontroli (0.06 pg/mg, Sl. 42e). Koncentracija GA₅ je bila vrlo niska i ista u embriogenim i neembriogenim eksplantatima, kao i u kontroli (Sl. 43h), dok GA₆ nije bio detektovan ni u jednom uzorku.

Egzogeni GA₃ u IMSE je izazvao drastično povećanje koncentracije endogenog GA₃ u embriogenim eksplantatima, koja je nakon 24h bila čak 50 433 puta veća u poređenju sa kontrolom, dok je nakon 7 dana detektovano blago smanjenje ovog GA, koje je i dalje bilo drastično veće u poređenju sa kontrolom (40 050 puta), zbog čega je GA₃ bio najzastupljeniji GA u embriogenim eksplantatima (Tabela 15, Sl. 43i). Očekivano, koncentracija GA₃ u neembriogenim eksplantatima je bila značajno niža. Posle 24h tretmana, u neembriogenim eksplantatima koncentracija GA₃ je bila 22 puta veća (1.32 pg/mg) u odnosu na kontrolu, da bi već posle 7 dana pala na nivo (0.08 pg/mg) približan kontroli (0.06 pg/mg, Tabela 15, Sl. 43i).

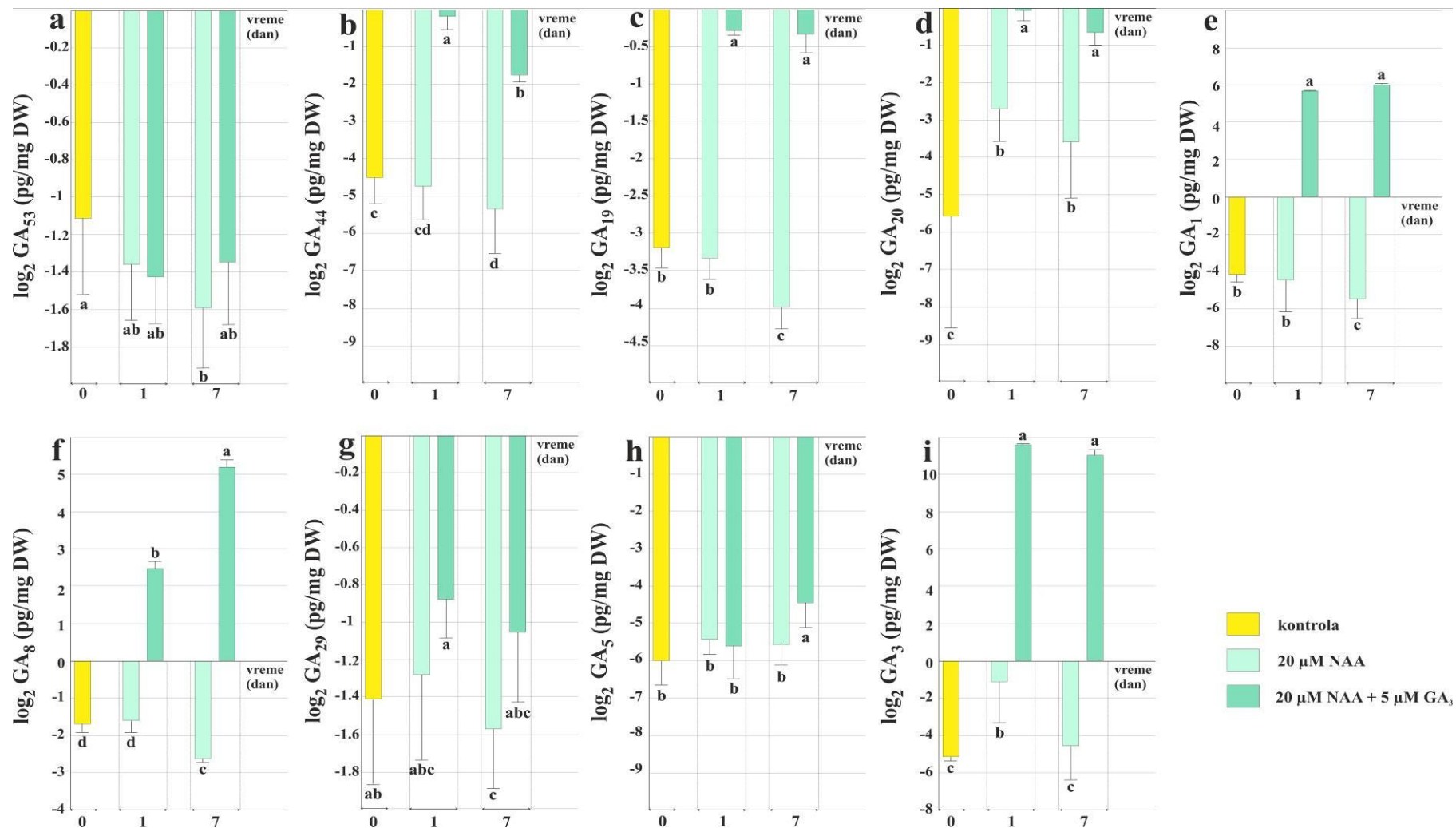
Produkti inaktivacije bioaktivnih GA, GA₂₉, GA₈ i GA₃₄, su detektovani u svim testiranim uzorcima, s tim da nije bilo statistički značajnih razlika u koncentracija GA₂₉ u svim tipovima eksplantata (Sl. 43g). Koncentracija GA₃₄ je takođe bila niska i približna u kontroli i neembriogenim eksplantatima, dok je u embriogenim eksplantatima bila značajno veća u poređenju sa kontrolom (3.3 puta posle 24h i 4 puta posle 7 dana) (Tabela 15). Među proizvodima inaktivacije bioaktivnih GA, najdramatičnije promene su uočene u koncentraciji GA₈, koja je u neembriogenim eksplantatima posle 24h kultivacije bila približna kontroli, da bi posle 7 dana kultivacije u tim eksplantatima bila dvostruko niža. Nasuprot tome, u embriogenim eksplantatima koncentraciji GA₈ je nakon 24h bila 16.8 puta veća (5.56 pg/mg), a nakon 7 dana čak 110.8 puta veća (36.56 pg/mg) nego u kontrolnim eksplantatima (Tabela 15) (Sl. 43f,g).

Tabela 15 - Povećanje (↑)/ smanjenje (↓) koncentracije GA u neembriogenim i embriogenim eksplantatima korenova u odnosu na kontrolu – apikalne odsečke korenova, koji su izolovani sa intaktnih klijanaca i odmah zamrznuti na -80°C za analizu GA. Podaci predstavljaju srednje vrednosti sadržaja giberelina izraženog u pg/mg suve mase bljnog tkiva (DW) \pm standardna devijacija izračunata za tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja.

Tretman	GA	Povećanje (↑)/ smanjenje (↓) u odnosu na kontrolu posle 24h	Povećanje (↑)/ smanjenje (↓) u odnosu na kontrolu posle 7d	Sadržaj GA pg/mg suve mase bljnog tkiva (DW) posle 24h	Sadržaj GA pg/mg suve mase bljnog tkiva (DW) posle 7d
Prekursori bioaktivnih GA					
20 μM NAA	GA ₅₃	↑ 1.2 x	↑ 1.4 x	0.40 \pm 0.30	0.34 \pm 0.32
	GA ₄₄	↑ 1.25 x	↑ 1.7 x	0.04 \pm 0.90	0.03 \pm 1.19
	GA ₁₅	↑ 3.2 x	↑ 1.3 x	0.11 \pm 1.43	0.46 \pm 0.55
	GA ₁₉	↑ 1.1 x	↑ 1.8 x	0.10 \pm 0.28	0.06 \pm 0.29
	GA ₁₃	↑ 4.3 x	↑ 2.0 x	0.13 \pm 0.56	0.06 \pm 0.44
	GA ₂₀	↑ 2.8 x	↑ 2.0 x	0.17 \pm 0.87	0.12 \pm 1.50
20 μM NAA + 5 μM GA ₃	GA ₅₃	↑ 1.3 x	↑ 1.2 x	0.37 \pm 0.25	0.40 \pm 0.33
	GA ₄₄	↑ 18.2 x	↑ 6 x	0.91 \pm 0.35	0.30 \pm 0.18
	GA ₁₅	↑ 2.2 x	↑ 2.3 x	0.16 \pm 1.43	0.68 \pm 2.45
	GA ₁₉	↑ 7.4 x	↑ 7.4 x	0.82 \pm 0.06	0.81 \pm 0.25
	GA ₁₃	↑ 3.3 x	↑ 3.0 x	0.10 \pm 0.61	0.09 \pm 0.28
	GA ₂₀	↑ 17 x	↑ 11.0 x	1.02 \pm 0.28	0.66 \pm 0.34
Bioaktivni GA					
20 μM NAA	GA ₁	↑ 1.3 x	↓ 2.0 x	0.08 \pm 1.71	0.03 \pm 1.06
	GA ₃	↑ 22.0 x	↑ 1.3 x	1.32 \pm 2.25	0.08 \pm 1.83
	GA ₄	↑ 1.7 x	↑ 1.8 x	0.37 \pm 0.23	0.40 \pm 0.65
	GA ₅	N	N	0.02 \pm 0.40	0.02 \pm 0.54
	GA ₇	↑ 1.3 x	N	0.04 \pm 0.36	0.03 \pm 0.30
20 μM NAA + 5 μM GA ₃	GA ₁	↑ 843.3 x	↑ 1054.2 x	50.6 \pm 0.05	63.25 \pm 0.08
	GA ₃	↑ 50 433.3 x	↑ 45 050.0 x	3026 \pm 0.07	2703 \pm 0.31
	GA ₄	↑ 60.0 x	↑ 34.1 x	13.2 \pm 0.11	7.50 \pm 0.11
	GA ₅	N	↑ 2.5 x	0.02 \pm 0.88	0.05 \pm 0.67
	GA ₇	↑ 135.7 x	↑ 57.3 x	4.07 \pm 0.10	1.72 \pm 0.12
Inaktivirani GA					
20 μM NAA	GA ₃₄	N	N	0.03 \pm 0.15	0.03 \pm 0.0001
	GA ₈	~ 1.03 x	↓ 2.1 x	0.34 \pm 0.31	0.16 \pm 0.09
	GA ₂₉	↑ 1.1 x	↓ 1.1 x	0.43 \pm 0.45	0.36 \pm 0.46
20 μM NAA + 5 μM GA ₃	GA ₃₄	↑ 3.3 x	↑ 4.0 x	0.10 \pm 0.25	0.12 \pm 0.13
	GA ₈	↑ 16.8 x	↑ 10.8 x	5.56 \pm 0.20	36.56 \pm 0.20
	GA ₂₉	↑ 1.4 x	↑ 1.28 x	0.55 \pm 0.20	0.50 \pm 0.37



Slika 42. Sadržaj 13-nehidroksilovanih giberelina u eksplantatima korenova kultivisanim na medijumu koji je sadržao 20 μ M NAA ili 20 μ M NAA+5 μ M GA_3 posle 1, odnosno 7 dana kultivacije. Kontrolni (K) eksplantati su odmah po izolaciji zaleđeni u tečnom azotu. Sadržaj endogenih GA je određen metodom tečne hromatografije visokih performansi (UPLC) sa sistemom za elektrosprej jonizaciju (ESI) i masenu spektrometriju (MS). Podaci predstavljaju srednje vrednosti sadržaja giberelina izraženog u pg/mg suve mase bljnog tkiva (DW) \pm standardna devijacija izračunata za tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu ($p \leq 0.05$).



Slika 43. Sadržaj 13-hidroksilovanih giberelina u eksplantatima korenova kultivisanim na medijumu koji je sadržao 20 μM NAA ili 20 μM NAA+5 μM GA₃ tokom 1, odnosno 7 dana. Kontrolni (K) eksplantati su odmah po izolaciji zaleđeni u tečnom azotu. Sadržaj endogenih GA je određen metodom tečne hromatografije visokih performansi (UPLC) sa sistemom za elektrosprej jonizaciju (ESI) i masenu spektrometriju (MS). Podaci predstavljaju srednje vrednosti sadržaja giberelina izraženog u pg/mg suve mase bljnog tkiva (DW) ± standardna devijacija izračunata za tri biološka ponavljanja, svako sa tri tehnička ponavljanja. Vrednosti na grafiku označene istim slovima nisu statistički značajno različite prema LSD testu (p<0.05).

5. Diskusija

U istraživanjima somatske embriogeneze kod spanaća, koja su prethodila ovom radu, nedvosmisleno je pokazano da giberelini i svetlost imaju odlučujući uticaj na pokretanje ovog procesa iz korenova spanaća (Milojević *et al.*, 2012b; Milojević, 2015). Zbog toga je u ovom radu detaljnije analiziran uticaj ova dva faktora na indukciju somatske embriogeneze iz apikalnih odsečaka korenova spanaća sorte „Matador“, koji su kao izolovani organi gajeni u uslovima *in vitro*.

Poznato je da je GA₃ esencijalan za indukciju somatske embriogeneze iz apikalnih odsečaka korenova spanaća (Komai *et al.*, 1996a, b; Knoll *et al.*, 1997; Ishizaki *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2013), kao i da svetlost ima veliki uticaj na homeostazu GA (Weller *et al.*, 2009; Hedden, 2016), ali i pored toga literaturni podaci o interakciji ovih faktora su limitirani na samo jednu publikaciju, koja se odnosi na uticaj GA₃ i svetlosti na regeneraciju pupoljaka iz kotiledona klijanaca spanaća (Geekiyana *et al.*, 2006). U skladu s tim, i mehanizam indukcije somatske embriogeneze kod ove biljne vrste je ostao u potpunosti neobjašnjen.

Pored svetlosti i GA, genetički faktor predstavlja jedan od najznačajnijih faktora koji utiče na indukciju somatske embriogeneze kod spanaća (Al Khayri *et al.*, 1991; Komai *et al.*, 1996a), koji je uzrok velike individualne varijabilnosti u embriogenom potencijalu spanaća (Ishizaki *et al.*, 2001; Milojević *et al.*, 2011, 2012; Milić *et al.*, 2017). Visoka genetička varijabilnost ove osobine, koja je posebno izražena kod kultivara spanaća „Matador“, otežava studiranje delovanja drugih faktora na proces somatske embriogeneze (Milojević *et al.*, 2012b). U skladu s tim, najpre su analizirane razlike u embriogenom potencijalu nasumično izabranih individua u okviru populacija klijanaca dobijenih isključivanjem semena sorte „Matador“ dobijenih od 9 evropskih proizvođača semena, kako bi se dobio pouzdan material za dalja istraživanja i prevazišao problem varijabilnosti biljnog materijala izazvane genetičkim i epigenetičkim faktorima.

5.1. Biljni materijal

Između klijanaca dobijenih isključivanjem semena 9 evropskih proizvođača semena su uočene velike razlike u pogledu brzine i frekvence klijanja, kao i brzine razvića klijanaca, odnosno vremena potrebnog da klijanci dostignu fazu razvića potrebnu za eksperiment (Tabela 1). Ove razlike se mogu pripisati ne samo genetičkim faktorima, jer semena potiču iz međusobno udaljenih kompanija koje imaju sopstvenu semensku proizvodnju, pa je verovatno da su i ove populacije genetički različite, već i različitim klimatskim uslovima pod kojima su gajene majke-biljake sa kojih su ubrana semena korišćena u eksperimentima u okviru ove teze. Te razlike, kao i stadijum zrelosti semena u momentu branja i uslovi njegovog skladištenja, su takođe mogli uticati na epigenetičke promene i fiziološko stanje embriona u semenima (Jaenisch & Bird 2003; Kapazoglou *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2019; Rothkegel *et al.*, 2020), koje su dalje doprinele varijabilnosti u razviću i embriogenom potencijalu jedinki.

5.2. Varijabilnost embriogenog potencijala na nivou populacija i individua

Značajna varijabilnost u embriogenom potencijalu kako jedinki u okviru populacije, tako i između populacija testiranih u okviru ove teze je opravdala pažnju koja je posvećena ovom problemu jer je utvrđeno izuzetno veliko variranje frekvence regeneracije, koje se kretalo u opsegu od 0% do 100% i u okviru populacije i kad se posmatraju eksplantati pojedinačnih klijanaca. Prosečan broj SE je

varirao između 0 i 14.4 u okviru populacije i čak 0-36 među eksplantatima pojedinačnih klijanaca (Sl. 5-8). U ovom istraživanju, Sl populacija je bila superiorna u odnosu na druge, jer su eksplantati izolovani sa ovih klijanaca imali ne samo najveću frekvencu regeneracije i prosečan broj SE po eksplantatu, već su regenerisali SE ranije od eksplantata drugih populacija. U prethodnim istraživanjima brži odgovor eksplantata uočen je kod linija spanaća sa visokim potencijalom za somatsku embriogenezu, ali samo kad su njihovi eksplantati bili kultivisani pod optimalnim svetlosnim uslovima (DD fotoperiod i intenzitet svetlosti od $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) u poređenju sa eksplantatima istih linija kultivisanim pod nepovoljnim svetlosnim uslovima (KD i niži ili veći intenzitet svetlosti, Milojević *et al.*, 2011, 2012).

Visoka varijabilnost u potencijalu za *de novo* regeneraciju uočena je između podvrsta, varijeteta i ekotipova u okviru jedne biljne vrste (Li *et al.*, 2013; Shmykova *et al.*, 2021). Kod *A. thaliana* je uočena izuzetno velika varijabilnost u *de novo* organogenezi pupoljaka između brojnih ekotipova (Candela *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2013; Motte *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018), a kod *Allium ascalonicum* značajna varijabilnost kaulogenog potencijala između testiranih jedinki (Tubić *et al.*, 2014). Štaviše, i jedinke čistih ili dihaploidnih linija su pokazivale značajnu varijabilnost u potencijalu za *de novo* regeneraciju, što je zapaženo kod luka (Bohanec, 2002), raži (Popelka & Altpeter, 2003) i kukuruza (Rakshit *et al.*, 2010). Visok nivo heterozigotnosti, nesinhronizovano cvetanje i kompleksna determinacija pola kod spanaća značajno doprinose varijabilnosti biljnog materijala i relativno niskom embriogenom potencijalu. Slični uzroci niskog embriogenog potencijala su označeni i kod drugih biljnih vrsta npr. manioke (Ceballos *et al.*, 2004).

Iako je genetička varijabilnost potencijala za *de novo* regeneraciju dugo već poznata (Armstrong *et al.*, 1992), i mehanizam ovog fenomena se već decenijama intenzivno proučava, do danas nije rasvetljen i nije jasno zašto eksplantati nekih jedinki u populaciji imaju veći regenerativni potencijal od drugih (Ikeuchi *et al.*, 2016). Pri proučavanju razlika između linija koje poseduju izrazito različit kapacitet za *de novo* regeneraciju uočene su kvantitativne razlike cele lepeze proteina sa vrlo raznovrsnim funkcijama. Tako je ustanovljeno da su kod jedinki sa i bez potencijala za *de novo* regeneraciju prisutne razlike u proteinima kao što su ferredoksinitrit reduktaza (Nishimura *et al.*, 2005), superoksid dismutaza (Lim *et al.*, 2008), DELLA proteini (Lombardi-Crestana *et al.*, 2012), receptor-kinaza (Motte *et al.*, 2014), tioredoksin (Zhang *et al.*, 2018) ili enzimi koji učestvuju u remodelovanju histona (Orłowska & Kępczyńska, 2018). Različite funkcije ovih proteina ukazuju na složenu prirodu indukcije *de novo* regeneracije, koja uključuje kompleksnu mrežu signalnih puteva hormona i remodelovanje hromatina, što je praćeno promenama u ekspresiji gena, homeostazi hormona, kao i odgovoru na stres i metaboličkim promenama (Zhao *et al.*, 2013; Motte *et al.*, 2014; Ikeuchi *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018; Orłowska & Kępczyńska, 2018; Ding *et al.*, 2020). Veruje se da polimorfizam u ligand vezujućem domenu ovih proteina može da prouzrokuje njihovu različitu aktivnost, a time i genetičke varijacije u regenerativnom potencijalu (Ikeuchi *et al.*, 2016). U skladu s tim, utvrđeno je da je razlika u ekspresiji WOX gena u nekim tkivima embriona i adultnih biljaka dve sorte vinove loze bila posledica razlika u samo nekoliko nukleotida u uzvodnim regulatornom regionu ovih gena (Bocacci *et al.*, 2017). Kod *Citrus* sp. je detektovana pozitivna korelacija između ekspresije *CsFUS3* i embriogenog potencijala kalusa nekoliko kultivara (Liu *et al.*, 2018a). Jedan od najilustrativnijih primera genetičke i epigenetičke kontrole procesa somatske embriogeneze je kultivar Jemalong *Medicago truncatula*, koji ima izuzetno nizak embriogeni potencijal, pa ipak među jedinkama ovog kultivara je selekcionisano nekoliko visokoembriogenih linija, za koje se smatra da su nastale usled epigenetičkih promena tokom kultivacije *in vitro* (Rose, 2019). Osim toga, smatra se da su embriogeni genotipovi osetljiviji prema auksinu od neembriogenih (Fehér, 2003). Nedavno

sekvenciranje genoma spanaća (Xu *et al.*, 2015b, 2017) zasigurno će omogućiti pronalaženje markera za selekciju genotipova sa visokim embriogenim potencijalom.

Velika individualna varijabilnost u embriogenom potencijalu koja je dobijena u ovom radu ukazuje da treba biti veoma obazriv prilikom odabira biljnog materijala za eksperimente, jer odabir jedinki sa većim embriogenim potencijalom za jedan tretman, a sa manjim embriogenim potencijalom za drugi tretman može dovesti do pogrešne interpretacije rezultata. Dobra ilustracija ovog problema je proučavanje uticaja svetlosti na regeneraciju SE iz apikalnih odsečaka korenova spanaća (Milojević *et al.*, 2012b) i regeneracija pupoljaka iz kotiledona spanaća (Geekiyana *et al.*, 2006). U prvoj studiji je za sve tretmane korišćen genetički identičan materijal i nesumnjivo je pokazano da fotoperiod i intenzitet svetlosti snažno utiču na embriogeni potencijal apikalnih odsečaka korenova spanaća, pri čemu su uslovi DD i intenzitet svetlosti od $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bili optimalni. Suprotno tome, Geekiyana *et al.* (2006) su za eksperimente koristili nasumično izabrane eksplantate iz populacije klijanaca spanaća sorte *Longstanding Bloomsdale Dark Green* i pokazali da je regeneracija pupoljaka iz kotiledona spanaća bila efikasnija u uslovima KD nego u uslovima DD. Kontradiktorni rezultati dobijeni u ovim studijama se mogu objasniti različitim potrebama korenova i kotiledona za svetlošću prilikom indukcije *de novo* regeneracije. Međutim, činjenica da srednje vrednosti frekvenci regeneracije pupoljaka iz kotiledona izloženim gotovo svim tretmanima u studiji Geekiyana *et al.* (2006) nisu međusobno bili statistički značajno različiti ukazuje da to može biti posledica izuzetno velike genetičke varijabilnosti biljnog materijala, kakva je uočena i u okviru ove teze. U tom smislu, i nivo poverenja u rezultat dobijen u ovoj studiji u mnogome zavisi od veličine uzorka koji je korišćen za svaki tretman.

Tokom istraživanja u okviru ove teze, selekcionisana je linija S1122, sa natprosečnim embriogenim potencijalom, koja je korišćena u nekim daljim istraživanjima. Nažalost, količina biljnog materijala nije bila dovoljna za sve eksperimente u okviru ove studije.

5.3. Histološka analiza

Histološka analiza eksplantata tokom indukcije somatske embriogeneze je pokazala višecelijsko poreklo SE koji potiču od ćelija pericikla korena spanaća, gde su uočeni brojni klasteri meristemskih ćelija. Ćelije pericikla korena poseduju izuzetan potencijal za regeneraciju SE (Yang *et al.*, 2010; Yumbla-Orbes *et al.*, 2017), ali i primordija izdanaka i korenova (Atta *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2012; Jani *et al.*, 2015). Dediferencijacija ćelija pericikla korena i njihov prelazak u proembrionalno tkivo ili meristemoide može dovesti do formiranja SE ili adventivnih pupoljaka, pri čemu su početne faze oba procesa iste (Yumbla-Orbes *et al.*, 2017). Kod *A. thaliana* pokazano je da su ćelije pericikla koje su locirane prema ksilemu pluripotentne i zahvaljući tome mogu da formiraju i primordije lateralnih korenova i meristem izdanaka (Atta *et al.*, 2009). Nedavno je pokazano da su primordije lateralnih korenova tokom vrlo kratkog perioda tokom razvića kompetentne za prelazak u meristem izdanaka, kao i da se meristem izdanaka može ponovo transformisati u primordiju lateralnog korena, zavisno od odnosa auksina i citokinina u meristemu lateralnog korena (Rosspopoff *et al.*, 2017).

Tokom početnih faza regeneracije SE u ovom radu uočene su perikline ćelijske deobe u periciklu korena. Prvi znak ćelijskog reprogramiranja i modifikacija u procesu razvića je promena pravca ćelijskih deoba (Kurczyńska *et al.*, 2007). Perikline, asimetrične deobe ukazuju na promene u razviću, što je uočeno kod mnogih biljnih vrsta tokom razvića SE, kao što su: *Trifolium repens* (Maheswaran & Williams, 1985), *Juglans regia* (Polito *et al.*, 1989) i *Helianthus annuus* × *H. tuberosus* (Chiappetta *et al.*, 2009). Još neke karakteristike ćelija takođe ukazuju na njihovo dalje

razviće i sudbinu. Čelije koje će se razviti u embrionalne ćelije su najčešće meristemske ćelije sa gustom citoplazmom, malim vakuolama i velikim jedrom. Međutim, samo neke ćelije sa meristemskim karakteristikama će se razviti u embrionalnu ćeliju. Oblik i struktura jedra mogu ukazivati na dalju sudbinu ćelije (Verdeil *et al.*, 2007).

Zanimljivo je da su neke studije pokazale različito poreklo primordija koje su regenerisale iz apikalnih odsečaka korenova spanaća koristeći iste BRR. Komai *et al.* (1996a), koji su koristili 10 μM NAA+0.1 μM GA₃ za indukciju somatske embriogeneze iz korenova spanaća, su dobili masivne kaluse na čijim površinama su se formirali SE nakon kultivacije na medijumu bez BRR. Međutim, Knoll *et al.* (1997) su pokazali direktnu regeneraciju pupoljaka iz epidermalnih i subepidermalnih ćelija, bez kalusne faze, iz apikalnih odsečaka korenova koji su gajeni na medijumu sa 20 μM NAA+5 μM GA₃.

5.4. Testiranje metode uzorkovanja biljnog materijala

Kako nije uvek moguće dobiti dovoljno genetički identičnog biljnog materijala za eksperimente (Milojević *et al.*, 2012b), bilo je neophodno pronaći adekvatnu metodu uzorkovanja kako bi se anulirao uticaj genetičkih razlika u biljnom materijalu na embriogeni potencijal eksplantata i omogućila procena uticaja drugih faktora na ovaj proces. Da bi se ispitala nova metoda uzorkovanja biljnog materijala, korišćena je ekspresija *SoRIP2* gena za kvantifikaciju embriogenog potencijala, kao i konvencionalno brojanje SE.

Imajući u vidu prisustvo *cis* elementa u promotorskom regionu *SoRIP2* gena, koji ukazuje na diurnalno variranje njegove ekspresije (Kawade & Masuda, 2009), najpre je testirano diurnalno variranje ekspresije ovog gena. Najveća ekspresija *SoRIP2* gena je detektovana u eksplantatima koji su uzorkovani 4h od početka izlaganja eksplantata svetlosti, te su apikalni odsecci korenova u svim daljim eksperimentima uzorkovani u to vreme. Ovo je u skladu sa opštim obrazcem ekspresije gena koji kodiraju proteine sa odbrambenom funkcijom, kao što je *SoRIP2*, za koje je pokazana maksimalna ekspresija tokom sredine obdanice, kad je i aktivnost patogena najveća (Rippmann *et al.*, 1997). Ovi rezultati su pokazali da se gen *SoRIP2*, iako nije direktno uključen u proces somatske embriogeneze, može koristiti kao pouzdan marker za ovaj proces jer ima izuzetno nizak nivo ekspresije u korenovima iz kojih se indukuje somatska embriogeneza i specifično se eksprimira na ranim stadijumima razvića SE. U skladu s tim, od 31 RIP gena pirinča, 20 se eksprimira u različitim organima pod normalnim uslovima, od kojih čak 12 gena ima vrlo nisku ekspresiju ili se uopšte ne eksprimiraju u korenovima (Jiang *et al.*, 2008). Od 30 RIP gena *Ricinus communis*, 10 gena je pokazivalo značajnu i varijablnu ekspresiju tokom razvića semena (Loss-Morais *et al.*, 2013). Slični rezultati su dobijeni i za niz drugih proteina koji se specifično eksprimiraju tokom procesa indukcije somatske embriogeneze i koriste se kao markeri za detekciju SE (Kurczyńska *et al.*, 2012; Tchorbadjieva, 2016; Domžalska *et al.*, 2017).

Ekspresija gena *SoRIP2* je bila značajno veća u eksplantatima gajenim na IMSE tokom 6-7 nedelja nego u kontroli, što ukazuje na prisustvo SE na ranim stadijumima razvića – od globularnog do ranog kotiledonarnog stadijumu razvića u ovim eksplantatima. Rezultati ekspresije *SoRIP2*, koji su bili očekivani i u skladu sa konvencionalnim brojanjem SE, ukazuju da je metoda uzorkovanja biljnog materijala testirana u ovom radu bila adekvatna, te je korišćena u daljem radu kad su kao polazni biljni materijal korišćeni klijanci nepoznatog embriogenog potencijala.

Ipak, podaci dobijeni nakon konvencionalnog brojanja SE i ekspresije *SoRIP2* su pokazali da su eksplantati izolovani sa S1 klijanaca za ovaj eksperiment imali dvostruko niži embriogeni potencijal nego što se očekivalo prema rezultatima dobijenim u prethodnom eksperimentu. Ovaj rezultat ukazuje

na još veću varijabilnost u regenerativnom odgovoru eksplantata čak i u slučaju populacije za koju je već utvrđeno da je bila superiorna u odnosu na druge ispitivane. I pored toga, prosečan broj SE po eksplantatu dobijen u ovom eksperimentu za Sl klijance je i dalje bio dvostruko veći od broja SE druge populacije po efikasnosti regeneracije testirane u ovom radu (Belić *et al.*, 2020a). Najveće povećanje ekspresije *SoRIP2* u eksplantatima izolovanih sa Sl klijanaca je prethodilo pojavi prvih uočljivih SE uz pomoć stereomikroskopa. To je takođe u skladu sa prethodnim istraživanjem u kojem je najveća ekspresija *SoRIP2* detektovana u globularnim SE koji se zbog proliferacije korena teško mogu uočiti čak i pod stereomikroskopom (Milić *et al.*, 2017). Odložen embriogeni odgovor eksplantata odabranih za analizu ekspresije *SoRIP2* bio je još jedan pokazatelj nižeg embriogenog potencijala ovih klijanaca.

Navedeni rezultati ukazuju da se varijabilnost biljnog materijala ne sme prevideti, jer ona može značajno uticati na interpretaciju rezultata, kao i da svaku seriju semena treba ispitati pre početka opsežnih eksperimenata. Takođe, metoda uzorkovanja korišćenja u ovom radu je bila adekvatna, čime se pokazala korisnom u slučaju kada su samo klijanci nepoznatog embriogenog potencijala dostupni kao biljni materijal. Primenom ove metode uzorkovanja u svim daljim eksperimentima, omogućilo je ispitivanje uticaja svetlosti i inhibitora giberelina na indukciju somatske embriogeneze spanaća, koje je zahtevalo veliki broj tretmana, a time i veliku količinu biljnog materijala za istraživanja.

5.5. Uticaj paklobutrazola na embriogeni potencijal eksplantata

Ispitivanjem mehanizma kojim GA_3 indukuje somatsku embriogenezu kod spanaća, ustanovljen je snažan sinergistički uticaj GA_3 i PAC na indukciju ovog procesa kod spanaća. Prisustvo varijabilnih koncentracija PAC u IMSE ili medijumu koji je sadržao 20 μM NAA kao jedini BRR, je značajno povećalo embriogeni potencijal eksplantata Sl klijanaca i visokoregenerativne linije S1122. Najveći embriogeni potencijal navedenih eksplantata je dobijen pri kombinaciji 2.5 μM PAC + IMSE, dok su u odsustvu GA_3 , na medijumu koji je sadržao 20 μM NAA, bile potrebne veće koncentracije PAC (10 μM) kako bi se indukovao najveći embriogeni potencijal eksplantata Sl klijanaca i linije S1122. U odsustvu PAC, na medijumu koji je sadržao 20 μM NAA kao jedini BRR, eksplantati Sl klijanaca nisu regenerisali SE, dok je embriogeni potencijal eksplantata S1122 na ovom medijumu bio najniži u poređenju sa svim ostalim testiranim tretmanima.

Kod većine biljnih vrsta egzogena primena auksina je jedna od najčešćih korišćenih metoda za sticanje kompetencije ćelija za prelazak na program embrionalnog razvika (Méndez-Hernández *et al.*, 2019). U tom pogledu auksini mogu direktno delovati, ali takođe mogu izazvati biosintezu IAA u biljnim ćelijama ili delovati kao faktor stresa (Fehér *et al.*, 2003; Gaj *et al.*, 2005). Međutim, rezultati dobijeni u ovom radu su pokazali da primena NAA kao jedinog BRR nije dovoljna za postizanje zadovoljavajućeg embriogenog odgovora u apikalnim odsečcima korenova spanaća, čak ni kod linije koja ima genetičku predispoziciju za ovoj proces, kao što je linija S1122. Ovaj rezultat je potvrdio već poznatu činjenicu da je prisustvo GA_3 neophodno za uspešnu indukciju somatske embriogeneze kod spanaća (Komai *et al.*, 1996a, b; Knoll *et al.*, 1997; Ishizaki *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2013).

Ipak, u ovom radu pored stimulativnog efekta GA_3 u indukciji somatske embriogeneze kod spanaća, pokazan je po prvi put i snažan pozitivan efekat PAC na embriogeni potencijal apikalnih odsečaka korenova spanaća. Štaviše, embriogeni potencijal eksplantata linije S1122 i Sl klijanaca je uvek bio veći kada je PAC dodat u IMSE, bez obzira na primenjenu koncentraciju, u poređenju sa eksplantatima koji su gajeni na medijumu sa NAA+PAC. Zanimljivo je istaći i činjenicu da je kod eksplantata linije S1122 kultivisanih na medijumu sa 20 μM NAA + 5 μM PAC, koja je ekvimolarna koncentraciji GA_3 u IMSE, dobijen prosečan broj SE približan prosečnom broju SE kod eksplantata ove linije kultivisanih na IMSE, što dovodi do zaključka da je PAC imao sposobnost da izazove

približan embriogeni odgovor u ovim eksplantatima kao i GA₃. Navedeni rezultati nesumnjivo ukazuju na postojanje snažnog sinergističkog uticaja GA₃ i PAC na povećanje embriogenog potencijala apikalnih odsečaka korenova spanaća.

U literaturi postoje primeri vrlo različitog uticaja PAC na indukciju somatske embriogeneze. Kod nekih biljnih vrsta PAC je stimulisao somatsku embriogenezu, kao kod *Pelargonium hortorum* (Hutchinson *et al.*, 1997), *Oncidium* (Chen & Chang, 2003), *Centaurea erythraea* (Subotić *et al.*, 2009), *Epipactis veratrifolia* (Moradi *et al.*, 2017) i *Phoenix dactylifera* (Hussam *et al.*, 2015). Ipak za razliku od spanaća, kod pomentih biljnih vrsta GA₃ je imao suprotan efekat od PAC, tj. inhibirao je proces somatske embriogeneze. Poznati su i primeri biljnih vrsta kod kojih je PAC inhibirao proces somatske embriogeneze, poput prokelja (Biddington *et al.*, 1992), *Medicago sativa* (Ruduš *et al.*, 2002), šargarepe (Mitsuhashi *et al.*, 2003) i *Medicago truncatula* (Igielski & Kępczyńska, 2017).

U ovom radu uočen je varijabilan uticaj PAC u zavisnosti od genetičke predispozicije eksplantata za somatsku embriogenezu. U skladu s tim, PAC je uvek imao veći uticaj na povećanje embriogenog potencijala eksplantata linije S1122, u poređenju sa njegovim efektom na eksplantate S1 klijanaca. Navedeno se može objasniti činjenicom da je linija S1122 superiornija u pogledu ispoljavanja embriogenog potencijala, za razliku od S1 klijanaca. Slične razlike u efektu PAC su dobijene u indukciji regeneracije pupoljaka putem indirektno organogeneze kod dve vrste *Pelargonium* sp. (Hamma *et al.*, 2012). U slučaju *P. domesticum* PAC je indukovao formiranje kalusa i uticao na povećanje broja regenerisanih pupoljaka, dok kod *P. hortorum*, kod kojeg dolazi do masivnog kalusiranja, PAC nije uticao na regeneraciju i izazvao je pojavu hiperhidratacije izdanaka (Hamama *et al.*, 2012). U prilog navedenim pretpostavkama ide činjenica da je kod *ga4* mutanta *A. thaliana*, koji poseduje nizak nivo endogenih GA ili smanjenu osetljivost tkiva na GA, PAC indukovao efikasniju regeneraciju pupoljaka u poređenju sa divljim tipom (Ezura & Harberd, 1995). Slično tome, smanjenje nivoa endogenih GA primenom PAC je stimulisalo somatsku embriogenezu iz korenova *pkl* mutanta *A. thaliana* (Ogas *et al.*, 1999). Međutim, postoje kontradiktorni rezultati koji su pokazali da povećanje količine endogenih GA promovise somatsku embriogenezu kod *A. thaliana*. Primena 1 μM i 5 μM PAC je inhibirala formiranje somatskih embriona kod *pkl* mutanta kada su kao eksplantati korišćeni nezreli zigotski embrioni (Gaj *et al.*, 2006).

Iako u literaturi ne postoje primeri slični spanaću o sinergističkom uticaju GA₃ i PAC na indukciju somatske embriogeneze, uočen je njihov stimulativan efekat na neke druge procese kod biljaka (Wang *et al.*, 2015b; Duan *et al.*, 2019). U skladu s tim, tretman GA₃ i GA₃+PAC je imao stimulativan efekat na izduživanje petiola kod celera (Duan *et al.*, 2019), dok su navedeni tretmani stimulisali razviće ćelija ksilema u korenovima šargarepe (Wang *et al.*, 2015b). Zanimljivo je i da je biomasa listova celera bila najveća na tretmanu GA₃+PAC, u poređenju sa tretmanima kada je bio prisutan samo GA₃ ili PAC (Duan *et al.*, 2019).

Varijabilan uticaj PAC na neki fiziološki proces, ali i indukciju somatske embriogeneze se može objasniti različitim početnom količinom endogenih GA u ispitivanom tkivu (Acheampong *et al.*, 2015). Upravo varijacije u endogenoj količini GA kod različitih ćelija i tkiva prouzrokuju varijabilan odgovor biljaka na tretman PAC, što može i da utiče na prirodu interakcije GA i PAC.

5.6. Uticaj trihostatina na embriogeni potencijal eksplantata

Kod brojnih biljnih vrsta, TSA je uticao na pokretanje procesa somatske embriogeneze (Li *et al.*, 2014; Wójcikowska *et al.*, 2018; Bie *et al.*, 2020; Awada *et al.*, 2020), zbog čega je njegov uticaj na indukciju somatske embriogeneze iz odsečaka korenova spanaća proučavan i u okviru ove teze.

TSA se primenjuje u niskim koncentracijama, najčešće 0.1-1 μM (Wójcikowska *et al.*, 2018; Bie *et al.*, 2020), najviše 10 μM (Awada *et al.*, 2020), a tretman najčešće traje 1-14 dana (Castillo *et al.*, 2020; Awada *et al.*, 2020), izuzetno 28 dana (Wójcikowska *et al.*, 2018), jer duži tretmani najčešće imaju inhibitorski uticaj na somatsku embriogenezu. Zato je za istraživanja u okviru ove teze izabran opseg koncentracija TSA 0.1-5 μM u trajanju 1-14 dana.

Kod *A. thaliana*, 0.1-1 μM TSA je mogao da zameni 2,4-D u indukciji somatske embriogeneze iz kotiledona izolovanih sa nezrelih zigotskih embriona i uticao je sa većom efikasnošću na indukciju somatske embriogeneze od 5 μM 2,4-D, koji se inače koristi kao optimalan tretman za indukciju somatske embriogeneze iz ovih eksplantata (Wójcikowska *et al.*, 2018). Kombinacija TSA i 2,4-D je delovala inhibitorski na somatsku embriogenezu iz ovih eksplantata i ta inhibicija nije bila specifična za tip auksina, jer su isto dejstvo imale IAA i NAA (Wójcikowska *et al.*, 2018). Zanimljivo je da u studiji Wójcikowska *et al.* (2018) nije testirano niti uočeno dejstvo DMSO na somatsku embriogenezu.

Osim toga, poznato je da GA_3 može da promoviše acetilaciju histona u promotorskom regionu i tako utiče na ekspresiju gena (Hou *et al.*, 2015). S druge strane, kod čak 80% gena *A. thaliana* na čiju ekspresiju utiče GA, neophodan je i PKL (Park *et al.*, 2017), koji ima vrlo značajnu ulogu u regulaciji odgovora biljke na GA. PKL i DELLA direktno interaguju protein-protein interakcijom i imaju antagonističko dejstvo na regulaciju procesa razvića (Zhang *et al.*, 2014b).

Imajući na umu gorenavedene činjenice, kao i činjenicu da su NAA i GA_3 esencijalni za indukciju somatske embriogeneze iz odsečaka korenova spanaća, eksperimenti u okviru ove teze su dizajnirani tako da se otkrije da li TSA može da zameni dejstvo nekog od navedenih BRR u cilju rasvetljavanja mehanizma njihovog delovanja. Dobijeni rezultati su pokazali da 0.1-5 μM TSA nije mogao da zameni nijedan od navedenih BRR. Međutim, eksplantati kultivisani na medijumu sa 1 μM NAA + 5 μM GA_3 ili 10 μM NAA su regenerisali SE sa niskom frekvencom (do 10%) kad je u medijumu bio prisutan TSA, dok eksplantati kultivisani na istim medijumima bez TSA nisu regenerisali, što ukazuje na pozitivan efekat TSA na indukciju somatske embriogeneze. Izostanak embriogenog odgovora kod eksplantata kultivisanih na medijumu sa 20 μM NAA, bez obzira na prisustvo ili odsustvo TSA, ukazuje na značaj interakcije TSA sa NAA. S obzirom na činjenicu da je 10 μM NAA ipak imao izvesno embriogeno dejstvo, kao i da pozitivan uticaj DMSO i TSA nije došao do izražaja u kombinaciji sa 20 μM NAA, ukazuje na složenu interakciju ovih faktora i moguće inhibitorsko dejstvo ove visoke koncentracije NAA na indukciju somatske embriogeneze.

U prisustvu 10 μM NAA + 5 μM GA_3 , TSA je uticao na značajno povećanje embriogenog potencijala, ali samo pri dužim TSA tretmanima u trajanju od 7 ili 14 dana. Eksplantati kultivisani na medijumu sa 20 μM NAA + 5 μM GA_3 su takođe imali veći embriogeni potencijal kad je u medijumu bio prisutan TSA, mada je u tom slučaju veći embriogeni odgovor dobijen kad su eksplantati tokom kraćeg vremena (1 ili 7 dana) bili izloženi TSA. Osim toga, činjenica da su eksplantati kultivisani na medijumu koji je sadržao DMSO bez TSA imali veći embriogeni potencijal od eksplantata kultivisanih na medijumu istog sastava bez DMSO i TSA ukazuje na izuzetno značajnu ulogu DMSO na indukciju somatske embriogeneze kod spanaća. DMSO se vrlo često koristi kao rastvarač teško rastvorljivih polarnih i nepolarnih jedinjenja, jer je zbog hidrofilne sulfoksid grupe i dve hidrofobne metil grupe rastvorljiv u vodi i sposoban da rastvori lipofilna jedinjenja. DMSO utiče na povećanje propustljivosti membrane, čime olakšava unos drugih jedinjenja u ćeliju (Omar & Novak, 1990; de Ménorval *et al.*, 2012), uklanja hidroksil radikal i pospešuje peroksidaciju (Kharasch & Thyagarajan, 1983). Osim toga, DMSO se koristi kao krioprotektant (Peng *et al.*, 2021), jer lako prodire kroz ćelijsku membranu i može da zameni vodu u ćeliji, a uočena je i njegov značajan antioksidativni potencijal (Sanmartín-Suárez *et al.*, 2011).

Uprkos činjenici da se DMSO vrlo često koristi kao rastvarač, između ostalog i za mnoge BRR, u literaturi je dostupan samo mali broj podataka o njegovom uticaju na *de novo* regeneraciju (Echávarri & Cistue, 2016). DMSO je stimulirao proces androgeneze kod nekoliko genotipova ječma (1.4-2.8 puta) i pšenice (1.1-1.5 puta) četvorodnevnom pretretmanom 1% rastvorom (Echávarri & Cistue, 2016). Kod pšenice je 1% DMSO značajno poboljšao konverziju embriona u zelene biljke kod genotipova kod kojih se teško postiže regeneracija. Somatski embrioni su se brže razvijali iz antera pretretiranih 1% DMSO. Autori su predložili mehanizam delovanja DMSO preko povećanja propustljivosti ćelijske membrane i njegove sposobnosti da eliminiše hidroksil radikal (Sanmartín-Suárez *et al.*, 2011).

Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim u okviru ove teze. DMSO bi povećanjem propustljivosti membrane stimulirao usvajanje NAA i GA₃ iz medijuma u ćeliju. Činjenica da je kraći tretman TSA/DMSO bio dovoljan za postizanje najvećeg embriogenog potencijala u prisustvu 20 µM NAA, dok je za približan embriogeni odgovor eksplantata kultivisanih na medijumu sa nižom koncentracijom NAA (10 µM) bio potreban duži TSA/DMSO tretman. Duži tretman u prisustvu 20 µM NAA je za posledicu imao niži embriogeni potencijal eksplantata, što ukazuje na inhibitorno dejstvo NAA. U prilog tome govori i činjenica da su u odsustvu GA₃ samo eksplantati kultivisani na medijumu sa 10 µM NAA pokazali embriogeni odgovor, za razliku od eksplantata kultivisanih na medijumu sa 1 ili 20 µM NAA.

U eksperimentima u okviru ove teze DMSO je dodat u sve medijume koji su sadržali TSA u istoj koncentraciji. Dalja istraživanja su potrebna da bi se razlučila uloga DMSO i TSA u ovom procesu i razjasnilo da li se DMSO može koristiti kao rastvarač za procenu uticaja TSA na embriogeni potencijal spanaća. U dostupnoj literaturi koja se odnosi na uticaj TSA na indukciju *de novo* regeneracije, DMSO je dominantno korišćen kao rastvarač TSA, mada se TSA može, ali znatno teže, rastvoriti i u etanolu. Kad se posmatra mogući doprinos DMSO indukciji somatske embriogeneze, treba imati na umu njegov antioksidativni potencijal. Osim toga, u animalnim ćelijama je pokazano da i sam DMSO može inhibirati deacetilaze histona (Marks & Breslow, 2007). U dostupnoj literaturi, koja se odnosi na *de novo* regeneraciju iz biljnih tkiva, nije uočena studija u kojoj je testiran ili komentarisano uticaj DMSO sa aspekta antioksidativnog delovanja ili inhibicije deacetilaze histona na biljna tkiva.

Činjenica da je u ovoj studiji embriogeni potencijal bio uvek veći u prisustvu TSA ukazuje da i sam TSA ima pozitivan uticaj na indukciju somatske embriogeneze. U većini slučajeva koncentracija TSA nije značajno uticala na embriogeni potencijal, već dužina TSA tretmana. Ipak, najčešće su najveće vrednosti EP indeksa dobijene za eksplantate kultivisane na medijumu sa 0.1-0.5 µM TSA. Optimalna koncentracija TSA za indukciju somatske embriogeneze zavisi od biljne vrste i sistema za regeneraciju. U velikom broju studija njegova optimalna koncentracija je bila 0.1-0.5 µM (Li *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2017; Wójcikowska *et al.*, 2018; Bie *et al.*, 2020; Castillo *et al.*, 2020), mada je za indukciju somatskih embriona i regeneraciju zelenih biljčica iz mikrospora pšenice duža kultivacija (28 dana) na medijumu koji je sadržao 0.008-0.01 µM TSA bila efikasnija nego kraći pretretman (10 min) mikrospora 0.1 µM TSA, dok tretman 0.5 µM TSA više nije imao pozitivan uticaj na indukciju somatske embriogeneze (Wang *et al.*, 2019b).

U eksplantatima kotiledona *A. thaliana* tretiranim 1 µM TSA nivo auksina, ROS, kao i ekspresija gena za transkripcione faktore ključne za pokretanje somatske embriogeneze (LEC1, LEC2, AGL15, MYB118, FUS i BBM, osim WUS), su bili značajno veći nego u eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR. TSA je uticao na povećanje ekspresije YUCCA gena, čime je bila povećana biosinteza auksina i pokrenuta kaskada derepresije transkripcionih faktora i gena koji učestvuju u reprogramiranju kompetentnih ćelija na embrionalni put razvića (Wójcikowska *et al.*, 2018). TSA i

2,4-D istim mehanizmom pokreću somatsku embriogenezu, s tim što TSA efikasnije deluje od 2,4-D jer može da indukuje somatsku embriogenezu čak i iz adultnih tkiva iz kojih 2,4-D to ne može (Wójcikowska *et al.*, 2018). Povećana koncentracija H₂O₂, kao i aktivnost SOD, POD i CAT, je detektovana u listovima tri dana starih klijanci kukuruza tretiranih 0.5 μM TSA (Wang *et al.*, 2016). Ovaj efekat je poništen u prisustvu tiouree, koja ima snažno antioksidativno dejstvo i utiče na smanjenje H₂O₂ (Wang *et al.*, 2016).

5.7. Uticaj svetlosti na embriogeni potencijal eksplantata

Za ispitivanje koji deo vidljivog spektra svetlosti utiče na pokretanje procesa somatske embriogeneze kod spanaća i koji receptor posreduje u tom procesu, eksplantanti SI klijanaca su kultivisani na IMSE u mraku ili u uslovima osvetljenja Fl ili LED lampi. Najveći embriogeni potencijal su imali eksplantati kultivisani pod B LED svetlošću, značajno niži eksplantati koji su bili izloženi dejstvu Fl i W LED svetlosti, dok je regeneracija somatskih embriona bila potpuno inhibirana u eksplantatima kultivisanim u mraku i pod R LED svetlošću. Imajući na umu da FL i W LED emituju svetlost šireg opsega talasnih dužina, koji uključuje i B svetlost, dobijeni rezultati ukazuju da u procesu indukcije somatske embriogeneze posreduje jedan od plavih pigmenta, dok ga fitohromi inhibiraju. FL i W LED emituju svetlost i u crvenom delu spektra, mada sa daleko nižim intenzitetom od plavog dela spektra. To objašnjava niži i međusobno sličan embriogeni potencijal eksplantata kultivisanih pod FL i W LED svetlošću.

Najveći broj publikacija ukazuje na stimulativan efekat kombinacije B i R LED svetlosti u indukciji organogeneze i somatske embriogeneze (Park *et al.*, 2010; Maluta *et al.*, 2013; Edesi *et al.*, 2014; Bello Bello *et al.*, 2017; Al-Mayahi, 2016; Silva *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016a; Almeida *et al.*, 2019). Crvena LED svetlost, kao i kombinacija R i B i kombinacija R i FR LED svetlosti su promovisale pojavu somatskih embriona iz fragmenata listova *Doritanaeopsis* sp. (Park *et al.*, 2010). Kod lekovite biljne vrste *Peucedanum japonicum* kombinacija R i B LED svetlosti u odnosu 8:1 je rezultovala maksimalnim brojem somatskih embriona dobijenih iz embriogenog kalusa indukovanog iz korena (Chen *et al.*, 2016a). Takođe, kombinacija W i B LED svetlosti je stimulisala pojavu skoro duplo više somatskih embriona iz embriogenog kalusa papaje u odnosu na FL svetlost (Almeida *et al.*, 2019).

Iako značajno malobrojniji, postoje i primeri slični spanaću u kojima je pokazan pozitivan uticaj pojedinačnih spektara LED svetlosti na indukciju regeneracije u uslovima *in vitro*, koji je bio značajno veći u poređenju sa dejstvom FL svetlosti. Kao što je i dobijeno u ovom radu, uslovi B LED svetlosti su bili optimalni za indukciju organogeneze kod *Anthurium* (Budiarto, 2010), *Dendrobium* (Lin *et al.*, 2011) i *Curculigo orchioides* (Dutta Gupta & Sahoo, 2015).

Jedan od mogućih mehanizama kojim različiti spektri LED svetlosti stimulišu regeneraciju biljaka u uslovima *in vitro* se ogleda u indukciji foto-oksidativnog stresa pod uticajem LED svetlosti, čime se remeti nivo ROS jedinjenja i aktivira antioksidativni sistem. Ove promene mogu povoljno uticati na povećanje potencijala za regeneraciju (Dutta Gupta & Sahoo, 2015). Kod *C. orchioides* akumulacija H₂O₂ pod uticajem B LED svetlosti bila je u korelaciji sa povećanjem regenerativnog potencijala (Dutta Gupta & Sahoo, 2015). Kada je u pitanju dalje razviće somatskih embriona u adultne biljke, takođe je pokazan pozitivan uticaj LED svetlosti. Somatski embrioni šećerne trske i vinove loze kultivisani pod B LED svetlošću u najvećoj meri su dostigli fazu maturacije (Tittmann *et al.*, 2015; Heringer *et al.*, 2017). Takođe, multiplikacija i konverzija somatskih embriona šećerne trske u adultne biljke je bila efikasnija pri kultivaciji eksplantata pod R i B LED svetlošću (Ferreira *et al.*, 2017). Nasuprot pozitivnom efektu B LED svetlosti na povećanje embriogenog potencijala apikalnih

odesečaka korenova spanaća koji je dobijen u ovom radu, R LED svetlost je potpuno inhibirala regeneraciju somatskih embriona. Slično tome, inhibitoran uticaj R LED svetlosti na indukciju regeneracije je pokazan kod *Rehmannia glutinosa* (Hahn *et al.*, 2000) i nevena (Heo *et al.*, 2002).

Kako bi se razjasnio uticaj LED svetlosti na razviće somatskih embriona, ali i na samu indukciju procesa somatske embriogeneze, odgovor bi se mogao pronaći u diferencijalnoj ekspresiji gena uključenih u metabolizam fitohormona, ali i zastupljenosti pojedinih proteina pod uticajem LED svetlosti različitog spektra (Heringer *et al.*, 2018; Almeida *et al.*, 2019). Biljke poseduju vrlo sofisticiran mehanizam za percepciju i transdukciju svetlosnog signala koji može indukovati promene na nivou genoma, transkriptoma i proteoma. Upravo ovakve promene u ćelijama im omogućavaju da steknu embriogenu kompetenciju (Barneche *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2019). Kod somatskih embriona šećerne trske koji su bili izloženi dejstvu B i R LED svetlosti dolazilo je do povećanja nivoa metil-transferaze čime se promenio obrazac metilacije DNK i na taj način zastupljenost pojedinih proteina (Heringer *et al.*, 2017). Pokazano je da se proteini vezani za produkciju energije, remodelovanje ćelijskog zida i intracelularnog transporta javljaju u većoj meri u somatskim embrionima papaje gajenim pod LED svetlošću (Almeida *et al.*, 2019).

5.8. Ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina u eksplantatima tokom indukcije somatske embriogeneze

S obzirom da se GA sintetišu samo u mladim delovima biljnih organa, najpre je testirano da li veličina eksplantata (1 mm i 1 cm) značajno utiče na nivo ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina. Poznato je da se u korenu intaktnih biljaka *A. thaliana*, GA sintetišu u ćelijama proksimalnog meristema korena, u kojima učestvuju u regulaciji proliferacije ćelija endodermisa (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). U zoni izduživanja korena, GA kontroliše izduživanje ćelija, takođe delujući na ćelije endodermisa korena (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). Postoje literaturni podaci koji ukazuju da je biosinteza GA zanemarljiva u zoni izduživanja korena (Desgagné-Penix & Sponsel, 2008) i da se u ovoj zoni ne eksprimira ni *GA2-ox* (Rieu *et al.*, 2008). U skaldu sa tim, Band *et al.* (2012) su predložili model koji predviđa smanjenje koncentracije GA u ćelijama endodermisa usled izduživanja, tako da se duž korena formira gradijent GA, sa maksimumom u proksimalnom meristemu korena.

Na osnovu navedenih činjenica, bilo je veoma važno utvrditi koja je veličina eksplantata pogodna za analizu ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam giberelina. U ovom radu, nije pokazana statistički značajna razlika u ekspresiji gena koji kodiraju ključne enzime za biosintezu (*GA20-ox1* i *GA3-ox1*) i inaktivaciju (*GA2-ox1*, *GA2-ox2* i *GA2-ox3*) GA u eksplantatima veličine 1 cm i 1 mm. Skorašnji literaturni podaci idu u prilog rezultatima koji su dobijeni u ovom radu i kontradiktorni su modelu koji su predložili Band *et al.* (2012) (Shani *et al.*, 2013; Rizza *et al.*, 2017; Barker *et al.*, 2020). Fluorescentnim obeležavanjem bioaktivnih GA, Shani *et al.* (2013) su došli do sličnih zaključaka, ali su utvrdili da do akumulacije GA dolazi u vakuolama ćelija endodermisa korena, dok rezultati Rizza *et al.* (2017) ukazuju na širu distribuciju GA u zoni izduživanja korena. Rezultati pomenutih publikacija ukazuju na postojanje transportnog sistema uz pomoć kojeg dolazi do akumulacije GA u zoni izduživanja korena (Shani *et al.*, 2013; Rizza *et al.*, 2017). U skladu sa tim su i rezultati najnovijeg istraživanja koji ističu da iako je proksimalni meristem korena glavno mesto biosinteze GA, ona se odvija i u ćelijama zone izduživanja korena (Barker *et al.*, 2020). Biosinteza GA, ali i aktivnost enzima *GA20-ox* u zoni izduživanja zavisi od akumulacije GA i njegovih prekursora u proksimalnom meristemu korena. Dok je transport *GA₂₀* i ranijih prekursora biosinteze GA ograničen duž korena, pokazan je efikasan transport *GA₁₉*, koji predstavlja supstrat za *GA3-ox* i

GA20-ox (Barker *et al.*, 2020). Zbog svega navedenog, ali i zbog lakše manipulacije biljnim materijalom, u svim daljim eksperimentima ekspresija gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam GA je analizirana u eksplantatima dužine 1cm.

U eksperimentima u okviru ove teze eksplantati izloženi svim testiranim tretmanima su uvek uzorkovani 4h od početka izlaganja svetlosti da bi se izbegao eventualni uticaj diurnalnog variranja ekspresije *SoGA20-ox1* na procenu uticaja drugih faktora na ekspresiju ovog gena u eksplantatima. Poznato je da cirkadijalni oscilator reguliše ekspresiju *GA20-ox* (Jackson *et al.*, 2000; Hisamatsu *et al.*, 2005), mada je kod *A. thaliana* pokazano da nisu svi geni familije *GA20-ox* pod kontrolom cirkadijalnog oscilatora (Hisamatsu *et al.*, 2005). U literaturi nema podataka da li je jedini klonirani gen spanaća *SoGA20-ox1* pod kontrolom cirkadijalnog oscilatora (Lee & Zeevaart, 2002, 2007), ali je izvesno da je njegova ekspresija pod fotoperiodskom kontrolom (Wu *et al.*, 1996). Ekspresija *GA20-ox* je najveća tokom obdanice, ali momenat kad dostiže maksimum (od momenta izlaganja svetlosti) je varijabilan kod različitih biljnih vrsta. U najvećem broju studija, sprovedenim na drugim biljnim vrstama, maksimum ekspresije *GA20-ox* je detektovan 3-4h od početka izlaganja svetlosti (Ait-Ali *et al.*, 1999; Hisamatsu *et al.*, 2005; Paparelli *et al.*, 2013).

U ovom radu analiziran je profil ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam GA u apikalnim odseccima korenova spanaća tokom indukcije somatske embriogeneze. Iako je detaljan profil ekspresije ovih gena u nadzemnim organima biljaka spanaća poznat, u literaturi nema podataka o njihovoj ekspresiji u korenu spanaća (Wu *et al.*, 1996; Lee & Zeevaart, 2002; 2005, 2007). U ovom radu ekspresija svih pet analiziranih gena je detektovana u apikalnim odseccima korenova spanaća koji su bili izloženi uslovima DD, što ukazuje da korenovi kao izloveni organi imaju autonomnu sposobnost da vrše percepciju svetlosti, ali i da sintetišu GA. Poznato je da intaktni korenovi, iako kao podzemni organi nisu direktno izloženi uticaju svetlosti, imaju sposobnost da vrše percepciju svetlosti, budući da eksprimiraju fotoreceptore (Galen *et al.*, 2007; Mo *et al.*, 2015). Međutim, o sposobnosti izolovanih korenova da autonomno sintetišu GA se vrlo malo zna. Pokazano je da odsecci korenova paradajza (1 cm) sadrže jedinjenja slična GA i posle kultivacije na medijumu bez BRR, ali je taj dokaz bio posredan, primenom biotesta u nedostatku sofisticiranih analitičkih metoda detekcije GA u vreme kad su ova istraživanja izvršena (Butcher, 1963). Kasnije je utvrđeno na osnovu poređenja rasteња korenova izolovanih sa biljaka divljeg tipa i GA mutanata paradajza da izolovani korenovi mogu autonomno da sintetišu GA (Butcher *et al.*, 1990).

U okviru ove studije, ekspresija svih 5 *GA-ox* gena je bila veća u izolovanim nego u intaktnim korenovima klijanaca već posle 24h od njihove izolacije. To svedoči da su izolovani korenovi bili sposobni za održanje homeostaze GA. Osim toga, treba imati u vidu da su izolovani korenovi izgubili kontrolu ne samo od strane izdanka, već i od strane glavnog korena. Dobar primer koji ilustruje uticaj hormona iz izdanka na koren je inhibicija *de novo* regeneracija pupoljaka iz korenova intaktnih klijanaca *A. thaliana*, koja je bila poništena primenom inhibitora transporta auksina u oblasti bazalnog dela korena, pa su ti korenovi stekli sposobnost regeneracije pupoljaka poput izolovanih korenova (Bernula *et al.*, 2020). Između glavnog i lateralnih korenova, kao i između mladih i starijih korenova, postoji niz sličnosti i razlika (Waidmann *et al.*, 2020). Glavni koren i lateralni korenovi različito reaguju na brojne hormonske stimuluse, kao i stimuluse iz okruženja (Waidmann *et al.*, 2020). Jedan od izuzetno važnih faktora prema kome se glavni i lateralni korenovi različito ponašaju je svetlost. Svetlost inhibira rasteње glavnog korena i izaziva negativnu fototropsku reakciju (Cluis *et al.*, 2004). Suprotno tome, lateralni korenovi klijanaca *A. thaliana* su duži kad se klijanci gaje na svetlosti nego u mraku (Moni *et al.*, 2015). Smatra se da ovaj proces zavisi od receptora plave svetlosti *PHOTOTROPIN-1* (PHOT1), jer kod *phot1* mutanata nema razlike u rasteњу lateralnih korenova na svetlosti i u mraku.

U ovom radu analiziran je profil ekspresije svih kloniranih gena spanača koji kodiraju ključne enzime za biosintezu i inaktivaciju GA u eksplantatima kultivisanim na IMSE (20 μ M NAA + 5 μ M GA₃), medijumu bez BRR ili medijumu koji je sadržao 20 μ M NAA ili 5 μ M GA₃ tokom 4 nedelje. Najdrastičnije promene u ekspresiji *SoGA20-ox1* i *SoGA3-ox1* su uočene poređenjem eksplantata kultivisanim na IMSE i medijum bez BRR. U skladu sa tim, u eksplantatima kultivisanim na IMSE, ekspresija *SoGA20-ox1* i *SoGA3-ox1* se konstatno smanjivala tokom čitavog indukcionog perioda, naspurot značajnom i konstantnom povećanju ekspresije ovih gena u eksplantatima gajenim na medijumu bez BRR. Pad ekspresije *SoGA20-ox1* i *SoGA3-ox1* se može objasniti aktiviranjem negativne povratne sprege, jer je prisustvo GA₃ u IMSE dovelo do povećanja nivoa endogenih GA (Israelsson *et al.*, 2004; Radi *et al.*, 2006). Takođe, u eksplantatima koji su gajeni na IMSE detektovano je povećanje ekspresije svih gena uključenih u katabolizam GA (*SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3*) koje se može objasniti aktiviranjem pozitivne povratne sprege. Regulacija biosinteze GA mehanizmom povratne sprege je veoma važna za održanje homeostaze GA koja je neophodna za odvijanje mnogih fizioloških procesa kod biljaka. Slično rezultatima dobijenim u ovom radu, egzogena primena GA₃ i GA₄ je izazvala povećanje ekspresije *AtGA2-ox6* u korenovima *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2004), dok je u korenovima šaragarepe pored povećanja ekspresije *DcGA2-ox1*, *DcGA2ox2* i *DcGA2-ox3*, dovela i do smanjenja ekspresije *DcGA20-ox1* i *DcGA20-ox2* (Wang *et al.*, 2015b). Pored sposobnosti GA da regulišu sopstvenu biosintezu mehanizmom povratne sprege, pokazano je i da auksini imaju veliki uticaj na biosintezu i signalni put GA (Weiss & Ori, 2007; Ross *et al.*, 2000, 2003, 2011, 2016). Mogući mehanizam kojim auksini utiču na smanjenje biosinteze GA se ogleda u njihovom uticaju na destabilizaciju DELLA proteina (Fu & Harberd, 2003), koji pozitivno regulišu *GA20-ox* i *GA3-ox*, a *GA2-ox* negativno regulišu (Desgagné-Penix & Sponsel, 2008). Inhibicijom DELLA proteina zbog prisustva NAA u IMSE, nivo endogenih GA bi bio povišen i izazvao bi pad ekspresije *SoGA20-ox1* zbog delovanja negativne povratne sprege, a posledica toga bi bio i niži nivo *SoGA3-ox1*, zbog smanjenja nivoa GA₂₀.

U eksplantatima kultivisanim na medijumu koji je sadržao 5 μ M GA₃ ili 20 μ M NAA ekspresija *SoGA20-ox1* se smanjivala samo tokom prvih 24 h odnosno 7 dana, nakon čega se ekspresija ovog gena povećavala do kraja eksperimenta. Navedeni rezultat dovodi do zaključka da prisutvo 5 μ M GA₃ ili 20 μ M NAA nije dovoljno da izazove konstantni pad ekspresije *SoGA20-ox1* u eksplantatima, već je za to potreban sinergistički uticaj auksina i GA, koji će prvobitno povećati nivo bioaktivnih GA, koji će onda negativnom povratnom spregom uticati na ekspresiju *SoGA20-ox1*. I zaista u ovom radu samo u eksplantatima kultivisanim na medijumu koji je sadržao NAA + GA₃ ekspresija *SoGA20-ox1* se smanjivala tokom čitavog perioda indukcije. Slično tome, ekspresija *SoGA3-ox1* se smanjivala tokom 7 dana u eksplantatima koji su gajeni na medijumu sa 20 μ M NAA, dok je prisustvo 5 μ M GA₃ izazvalo smanjenje ekspresije ovog gena tokom čitavog trajanja eksperimenta. Smanjenje ekspresije *SoGA3-ox1* u eksplantatima kultivisanim na medijumu sa 5 μ M GA₃ se može objasniti mehanizmom održanja homeostaze endogenih GA pod uticajem egzogene GA₃, ali i činjenicom da kod pojedinih biljnih vrsta ovaj gen nije pod snažnom kontrolom negativne povratne sprege kao *GA20-ox*. Kod transgenih linija hibridne topole *Populus tremula*, prekomerna ekspresija *GA20-ox* je dovela do povećane sinteze bioaktivnih GA, dok je kod transgenih biljaka sa prekomernom ekspresijom *GA3-ox* dolazilo do povećane aktivnosti 3- β -hidroksilacije, ali nije bilo prisutno povećanje nivoa bioaktivnih GA, niti je dolazilo do promena u rastenju i morfologiji biljaka (Israelsson *et al.*, 2004). Slično tome, prekomerna ekspresija *PsGA3-ox* graška u biljkama duvana, dovela je samo do neznatnih promena u morfologiji biljaka i količini bioaktivnih GA (Gallego-Giraldo *et al.*, 2008).

Nasuprot drastičnim razlikama u ekspresiji *SoGA20-ox1* i *SoGA3-ox1* koje su uočene u embriogenim i neembriogenim eksplantatima, ekspresija sva tri gena uključena u inaktivaciji GA

(*SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3*) je bila povećana u eksplantatima gajenim na IMSE, ali i u eksplantatima gajenim na medijumu bez BRR tokom čitavog trajanja eksperimenta. Prisustvo 20 μM NAA ili 5 μM GA_3 u medijumu je dovelo do povećanja ekspresije *SoGA2-ox1* i *SoGA2-ox2* u eksplantatima, ali je ono bilo manje u poređenju sa povećanjem ekspresije pomenutih gena u eksplantatima gajenim na IMSE ili bez BRR. Ekspresija *SoGA2-ox3* je bila manja u eksplantatima kultivisanim na medijumu sa 20 μM NAA, dok u eksplantatima gajenim na medijumu sa 5 μM GA_3 bila blago povećana. Iako je detektovano povećanje u ekspresiji *SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3* na IMSE i medijumu bez BRR, razlike se uočavaju u njihovim nivoima ekspresije. U eksplantatima gajenim na medijumu bez BRR najveće povećanje od 60 puta je detektovano u ekspresiji *SoGA2-ox1*, dok je u eksplantatima kultivisanim na IMSE do najvećeg povećanja od 17 puta dolazilo u ekspresiji *SoGA2-ox2*. Navedeni rezultat ukazuje na mogućnost postojanja različitih uloga *SoGA2-ox1* i *SoGA2-ox2* kod spanaća tokom indukcije somatske embriogeneze. Poznato je da somatska embriogeneza predstavlja odgovor biljaka na stresne uslove, a da primena visokih koncentracija BRR za indukciju ovog procesa itekako utiču stresno na biljne ćelije (Pasternak *et al.*, 2002). Moguće je da u slučaju somatske embriogeneze spanaća, upravo stresni uslovi indukuju povećanje ekspresije *SoGA2-ox2* u eksplantatima kultivisanim na IMSE, a da je nasuprot takvim uslovima u eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR indukovana ekspresija *SoGA2-ox1*. Kako je ekspresija *SoGA2-ox3* uvek bila niža u poređenju sa ekspresijom *SoGA2-ox1* i *SoGA2-ox2* na svim testiranim tretmanima, može se zaključiti da ovaj gen nema značajnu ulogu u uslovima koji su testirani u ovom radu.

Slično tome, kod *A. thaliana* su pokazane različite uloge *AtGA2-ox* u zavisnosti od tkiva u kom se eksprimiraju i fiziološkog procesa u kojem učestvuju (Yamauchi *et al.*, 2004, 2007; Magome *et al.*, 2008; Pimenta-Lange & Lange, 2015; Wiesen *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017, 2019b). U slučaju *A. thaliana* *AtGA2-ox* kodira familija od 8 gena, *AtGA2-ox1*, 2, 3, 4, 6, 7 i 8, dok je *AtGA2-ox5* verovatno pseudogen (Hedden *et al.*, 2000). Pokazano je da povećanje ekspresije *AtGA2-ox2* suprimira klijanje semena *A. thaliana* pod uticajem svetlosti i temperature (Yamauchi *et al.*, 2004, 2007). KNOX (*KNOTTED1-like homeobox*) transkripcioni faktor promovira formiranje apikalnog meristema izdanka indukujući ekspresiju *AtGA2-ox2* i *AtGA2-ox4* čime se smanjuje nivo bioaktivnih GA, dok deacetilaze histona (HDT1/2) kontrolišu broj ćelija apikalnog meristema korena smanjujući ekspresiju *AtGA2-ox2* (Li *et al.*, 2017). Nasuprot veoma važnim ulogama *AtGA2-ox2* i *AtGA2-ox4* u formiranju apikalnog meristema korena i izdanka kod *A. thaliana*, pokazano je da povećana ekspresija *AtGA2-ox6* u cvetovima stimuliše produkciju nektara (Wiesen *et al.*, 2015). U uslovima visokog saliniteta se indukuje ekspresija *AtGA2-ox7* dovodeći do promene u morfologiji i boljoj adaptaciji biljaka *A. thaliana* na stresne uslove (Magome *et al.*, 2008; Pimenta-Lange & Lange, 2015).

Korelacija između sticanja embriogenog potencijala i ekspresije gena uključenih u metabolizam GA je uočena i kod drugih biljnih vrsta, ali su literaturni podaci i dalje oskudni i ne postoji jasna slika o ulozi GA u indukciji somatske embriogeneze. Kod šargarepe, nivo ekspresije *DsGA20-ox* i *DsGA2-ox* se nije značajno menjao tokom indukcije somatske embriogeneze, dok je nivo ekspresije *DsGA3-ox* bio značajno povećan (Mitsubishi *et al.*, 2003). Slično tome, tokom indukcije somatske embriogeneze kod *Medicago truncatula* je detektovano povećanje ekspresije *MtGA3-ox1* i *MtGA3-ox2* (Igielski & Kępczyńska, 2017). Međutim, za indukciju somatske embriogeneze kod *M. truncatula* nije neophodna egzogena primena GA (Igielski & Kępczyńska, 2017). Nasuprot tome, povećanje ekspresije *AtGA2-ox6* je bilo u korelaciji sa aktivacijom 35S:AGL15 čime se promovisala somatska embriogeneza kod *A. thaliana*. Transformanti sa povećanom ekspresijom 35S:*AtGA2-ox6* su ispoljavali daleko veći embriogeni potencijal u poređenju sa *ga2-ox* mutantima (Wang *et al.*, 2004). Navedeni rezultati podržavaju hipotezu da indukciju somatske embriogeneze kod nekih biljnih vrsta, uključujući i spanać, favorizuje smanjenje ekspresije gena uključenih u biosintezu GA i povećanje

ekspresije gena uključenih u katabolizam GA. Ipak ova hipoteza zahteva dalja istraživanja, jer postoji nekoliko činjenica koje se ne smeju zanemariti. S obzirom da postoji veliki broj dokaza o uzajamnoj interakciji auksina i GA, dalja istraživanja bi nesumnjivo trebala da se odnose na analizu ekspresije gena koja bi rasvetlila prirodu ove interakcije tokom indukcije somatske embriogeneze.

Ne sme se zanemariti ni činjenica da je regulacija biosinteze i metabolizma GA vrlo složena, jer GA učestvuju u realizaciji mnogih programa razvića biljnog organizma, kao što je izduživanje stabla, lista i korena. Jedan od načina kontrole nivoa GA je pokretanje njegovog katabolizma indukovanjem ekspresije *GA2-ox* (Nelissen *et al.*, 2012). Zato na ekspresiju ovog gena, kao što je već pomenuto, utiče veliki broj faktora. Kontrola ekspresije *GA2-ox* je ne samo mehanizam kojim se u odgovarajućim vremenskim sekvencama smenjuju programi sukcesivnih faza tokom ontogenije, već i mehanizam kojim biljke usklađuju svoje rasteenje sa uslovima u okruženju (Claeys & Inzé, 2013). Drugi način kontrole nivoa GA se ogleda u vrlo kompleksnoj regulaciji ekspresije *GA20-ox* koja se odvija na više hijerarhijskih nivoa, jer je enzim *GA20-ox* ključan za održanje homeostaze GA. U skladu s tim, ekspresija *AtGA20-ox1* je regulisana na nivou organa, tkiva i ćelija, specifičnog stadijuma razvića i metabolički je autoregulisana negativnom povratnom spregom (Desgagné-Penix & Sponsel, 2008). Regulacija na jednom nivou je moguća samo ako to dozvoljava hijerarhijski viši nivo regulacije; npr. tretman paklobutrazolom stimuliše ekspresiju *AtGA20-ox1* u kotiledonima i listovima *A. thaliana* 6 dana starih klijanaca, dok taj efekat izostaje u kotiledonima 10 dana starih klijanaca, što ukazuje da je regulacija nivoa GA određena stupnjem razvića snažnija od metaboličke regulacije (Desgagné-Penix & Sponsel, 2008). Četvrti nivo regulacije vrše auksini, pri čemu je metabolička regulacija snažnija od regulacije auksinima; npr. NAA ne stimuliše ekspresiju *AtGA20-ox1* u korenovima *A. thaliana* zbog njegove niske organ-specifične ekspresije (Desgagné-Penix & Sponsel, 2008).

Kako su u ovom radu eksplantati gajeni na svim testiranim tretmanima bili izloženi uslovima DD u obzir se mora uzeti i uticaj svetlosti na ekspresiju gena uključenih u biosintezu i metabolizam GA. Ekspresija *SoGA20-ox1* je pod snažnom fotoperiodskom kontrolom kod spanaća (Wu *et al.*, 1996; Lee & Zeevaart 2002, 2005, 2007), što je pokazano i kod drugih biljnih vrsta (Ait-Ali *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2000; Hisamatsu *et al.*, 2005). Za ekspresiju *GA3-ox1* i *GA2-ox1* se smatra da nije pod fotoperiodskom kontrolom, već da zavisi od dostupnosti supstrata GA_{20} (Hisamatsu *et al.*, 2005).

Iz svega priloženog je očigledno da interakcija svetlosti, auksina i GA utiče na biosintezu i metabolizam GA u apikalnim odsećima korenova spanaća, ali da je sama po sebi izuzetno kompleksna, a to važi i za njen uticaj na ekspresiju embriogenog potencijala. Naposljetku ne sme se zanemariti ni činjenica da kod spanaća nisu klonirani svi geni uključeni u metabolizam i signalni put GA, a koji bi mogli imati ulogu indukciji somatske embriogeneze.

5.9. Uticaj paklobutrazola na ekspresija gena za metabolizam giberelina u izolovanim odsećima korenova spanaća

Pošto je u ovom radu pokazan snažan sinergistički uticaj GA_3 i PAC na indukciju somatske embriogeneze kod spanaća, u cilju ispitivanja njihovog mehanizma delovanja, analizirana je ekspresija ključnih gena za metabolizam GA u eksplantatima kultivisanim na IMSE ili medijumu koji je sadržao NAA u odsustvu ili prisustvu PAC 24 h, 7, 14 i 28 dana od početka tretmana. Kao što je već dobijeno u ovom radu u okviru prethodnog eksperimenta, u odsustvu PAC, na medijumu koji je sadržao NAA, ekspresija *SoGA20-ox1* se smanjivala samo tokom prvih 24h sata trajanja eksperimenta, da bi nakon toga bila značajno veća u poređenju sa kontrolom, dok se ekspresija *SoGA3-ox1* konstantno povećavala tokom čitavog trajanja eksperimenta. Iako je u eksplantatima kultivisanim na medijumu sa

NAA, detektovano povećanje ekspresije svih analiziranih gena uključenih u katabolizam GA (*SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3*), navedeno povećanje je bilo najmanje u poređenju sa svim ostalim testiranim tretmanima. Nasuprot tome, u eksplantatima kultivisanim na IMSE uočen je konstantni pad ekspresije gena uključenih u biosintezu GA (*SoGA20-ox1* i *SoGA3-ox1*), što je bilo praćeno značajnim povećanjem ekspresije gena uključenih u katabolizam GA (*SoGA2-ox1*, *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3*). Prisustvo PAC u IMSE ili medijum koji je sadžao NAA je izazvao isti trend u ekspresiji svih analiziranih gena koji je dobijen u eksplantatima kultivisanim na IMSE. Ovaj rezultat je još jednom nesumnjivo potvrdio da u uslovima koji su pogodni za indukciju somatske embriogeneze kod spanaća (NAA+PAC, IMSE+PAC i IMSE) favorizovano smanjenje u ekspresiji gena uključenih u biosintezu GA i povećanje ekspresije gena uključenih u katabolizam GA. Iako je na pomenutim tretmanima uočen varijabilan embriogeni odgovor eksplantata koji je bio najveći kada je PAC dodat u IMSE, to se nije odrazilo na ekspresiju gena uključenih u metabolizam GA, jer nije dobijena statistički značajna razlika između tretmana NAA+PAC, IMSE+PAC i IMSE, što dovodi do zaključka da PAC stimuliše somatsku embriogenezu kod spanaća nekim drugim mehanizmom koji ne podrazumeva samo promene na nivou ekspresije gena uključenih u metabolizam GA.

Kao što je dobijeno u ovom radu, u korenovima, listovima i petiolama šargarepe tretman GA_3 i GA_3 +PAC je uticao na smanjenje ekspresije gena koji kodiraju enzime uključene u biosintezu GA i na povećanje ekspresije gena za enzime uključene u katabolizam GA. U korenovima šargarepe nije uočena statistička značajnost u ekspresiji gena uključenih u metabolizam GA između navedenih tretmana, iako je pokazan sinergistički uticaj GA i PAC na razviće ćelija ksilema u korenu (Wang *et al.*, 2015b). Sličan trend u ekspresiji gena pod uticajem GA_3 i GA_3 +PAC je uočen u internodijama 30 dana starih biljaka jute, gde je detektovano smanjenje ekspresije *CoGA20-ox7* i *CoGA3-ox2* koje je bilo praćeno povećanjem ekspresije *CoGA2-ox5*, dok je prisustvo samo PAC izazvalo suprotan trend u ekspresiji pomenutih gena (Honi *et al.*, 2020). Dok se uticaj GA_3 ogleda u povećanju količine endogenih GA, čime se pokreće mehanizam negativne povratne sprege, što za posledicu ima smanjenje ekspresije gena uključenih u biosintezu GA, uticaj PAC na nivo endogenih GA je suprotan, jer on blokira aktivnost ent-kauren oksidaze, inhibirajući time sintezu bioaktivnih GA (Zhang *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2019). Smanjenje količine endogenih GA pod uticajem PAC dovodi do povećanja ekspresije *GA20-ox* i *GA3-ox* u cilju održavanja homesostaze GA. Ipak, uticaj PAC na ekspresiju gena uključenih u metabolizam GA je vrlo varijabilan u zavisnosti od biljne vrste i analiziranog tkiva. U skladu sa tim, PAC nije uticao na promenu ekspresije *GA20-ox*, ali je doveo do povećanja ekspresije skoro svih ostalih gena uključenih u biosintezu GA (*KS*, *KO*, *KAO*, *GA3-ox1*) u petiolama celera, dok je u listovima imao suprotan efekat, što ukazuje da uticaj PAC na ekspresiju gena uključenih u biosintezu GA može biti tkivno-specifičan (Duan *et al.*, 2019).

Iako se glavni i direktan uticaj PAC na količinu endogenih GA ostvaruje kroz promene na nivou ekspresije gena uključenih u biosintezu i metabolizam GA, uočen je njegov vrlo kompleksan indirektni uticaj koji se ogleda u promeni ekspresije gena uključenih u signalni put i transport GA. PAC nije uticao na promenu ekspresije gena uključenih u biosintezu GA kod *Agapanthus praecox* i *Jatropha curcas*, već gena uključenih u transdukciju GA signala (Zhang *et al.*, 2015; Seesangboon *et al.*, 2018). Slično tome, PAC kod *Glycine max* je uticao na povećanje ekspresije *GID1* receptora i gena koji kodiraju protein *NITRATE TRANSPORTER 3/PEPTIDE* (*NPF3*), koji učestvuje u transportu GA (Gazara *et al.*, 2019). Prostorno-vremenska ekspresija *NPF3* gena je važna za uspostavljanje gradijenta GA, što je neophodno za odvijanje nekog fiziološkog procesa (Tai *et al.*, 2016). U skladu sa tim, kod *A. thaliana* je pokazano da uspostavljanje gradijenta GA pod uticajem *NPF3* stimuliše izduživanje hipokotila u mraku (Rizza *et al.*, 2017, 2018) dok je kod *G. max* stimulisao klijanje embriona (Souza *et al.*, 2017). Takođe, kod *G. max* je uočeno inhibitorno dejstvo PAC na ekspresiju gena koji kodiraju

DELLA proteine, glavne represore signalnog puta GA (Gazara *et al.*, 2019). Kako povećanje ekspresije gena koji kodiraju DELLA proteine onemogućava efekat GA u nekom fiziološkom procesu (Achard *et al.*, 2003), inhibicijom DELLA proteina, indirektni uticaj PAC bi bio stimulacija fiziološkog procesa koji je posredovan GA. S obzorom da se pozitivan efekat PAC na povećanje embriogenog potencijala koji je dobijen u ovom radu, nije ispoljio u vidu promena u ekspresiji gena uključenih u metabolizam GA, moguće je da PAC upravo preko pomenutih mehanizama indirektno uticao na nivo endogenih GA i na taj način promovisao indukciju somatske embriogeneze kod spanaća.

Navedeni primeri jasno ukazuju na veoma kompleksan uticaj PAC na metabolizam GA, koji se ostvariju putem različitih mehanizama kod različitih biljnih vrsta. Ipak, efekat PAC na neki fiziološki proces se ne može pripisati samo njegovom uticaju na metabolizam GA, jer je pokazano da PAC može da utiče i na metabolizam i signalne puteve drugih fitohormona. PAC je uticao na povećanje nivoa endogene IAA, polarnih transportera, PIN i LAX1, gena uključenih u biosintezu auksina (*YUCCA*) i transkripcionog faktora ARF (Opio *et al.*, 2020). Poznato je da povećanje nivoa endogene IAA u eksplantatima omogućava sticanje embriogene kompetencije (Dudits *et al.*, 1991; Jiménez & Thomas, 2006; Ikeda-Iwai *et al.*, 2003), a da polarni transport utiče na formiranje gradijenta auksina, čime se uspostavlja apikalno-bazalna osa embriona (Robert *et al.*, 2013; Wabnik *et al.*, 2013). Pored toga, PAC je uticao na smanjenje biosinteze etilena, a povećao je nivo endogene ABA i citokinina (Seesangboon *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020b). Sve navedeno ukazuje na kompleksno direktno i indirektno delovanje PAC, koja se posebno odnosi na različiti promene u endogenom nivou fitohormona.

5.10. Uticaj svetlosti na ekspresija gena za metabolizam giberelina u izolovanim odsečcima korenova spanaća

U ovom radu je pokazano da FL svetlost, pod kojom se inače gaje embriogeni eksplantati, pozitivno utiče na ekspresiju *GA-ox* gena. Kad se porede sa intaktim korenovima klijanaca, odsecci korenova kultivisani na medijumu bez BRR pod FL svetlošću pokazuju već posle 24 h značajno veću ekspresiju svih *GA-ox* gena, za razliku od eksplantata kultivisanih na medijumima sa NAA, GA₃ ili NAA+GA₃ (Sl. 25-29). Slično tome, u odsečcima korenova kultivisanih na medijumu bez BRR pod FL svetlošću ekspresija svih *GA-ox* gena je bila značajno veća u odnosu na odsečke korenova kultivisane na istom medijumu u mraku (Sl. 35).

Međutim, profil ekspresije *GA-ox* gena u odsečcima korenova kultivisanih u prisustvu NAA+GA₃ pod FL svetlošću je bio značajno različit u odnosu na odsečke korenova kultivisane na medijumu bez BRR pod istom svetlošću (Sl. 36). Naime, u eksplantatima kultivisanim na IMSE je došlo do značajnog smanjenja ekspresije *SoGA20-ox1* i *SoGA3-ox1* i značajnog povećanja ekspresije *SoGA2-ox2* i *SoGA2-ox3* u odnosu na odsečke korenova kultivisane na medijumu bez BRR. Ovaj rezultat ukazuje da prisustvo svetlosti ima manji uticaj na ekspresiju *GA-ox* gena od povratne sprege za održanje homeostaze GA pokrenute egzogenim NAA+GA₃.

U literaturi je poznato da plava LED svetlost utiče na represiju sinteze GA i auksina (Folta *et al.*, 2003). U hipokotilama *A. thaliana* je detektovano smanjenje ekspresije *GA20-ox* u eksplantatima kultivisanim pod B LED svetlošću (Folta *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2007). Tome slično, u hipokotilima paradajza B svetlost je inhibirala biosintezu GA, dok je uticala na povećanje ekspresije *GA2-ox* gena (Matsuo *et al.*, 2018). Međutim, u navedenim primerima iz literature eksplantati nisu bili izloženi uticaju egzogene GA₃. U ovom radu nije došlo do značajne promene u ekspresiji *GA-ox* gena tokom indukcije somatske embriogeneze iz odsečaka korenova spanaća kultivisanih pod uticajem različitih

svetlosnih izvora. To ukazuje da B svetlost ne utiče na značajno povećanje embriogenog potencijala eksplantata delovanjem na ekspresiju *GA-ox* gena, već nekim drugim mehanizmom.

U somatskim embrionima papaje koji su gajeni pod B LED svetlošću došlo je do povećanja ekspresije *GH3* gena koji kodira enzim koji vrši konjugaciju IAA i amino kiselina, vršeći inaktivaciju auksina (Almeida *et al.*, 2019). Pored toga, B LED svetlost posredstvom CRY1 fotoreceptora je uticala na destabilizaciju ARF transkripcionog faktora, sprečavajući njegovo vezivanje za promotore auksinskih gena (Mao *et al.*, 2020). Kao i u slučaju auksina, B svetlost je dovela do drastičnih promena u ekspresiji gena uključenih u biosintezu GA, ali nije uticala na njegov signalni put (Alabadi *et al.*, 2008; Weller *et al.*, 2009).

Pokazano je i da B svetlost može da utiče na ekspresiju nekoliko gena koji dovode do inhibicije rasteња biljaka (Folta *et al.*, 2003), čime se može objasniti da iako je broj somatskih embriona dobijenih u ovom radu bio najveći na eksplantatima kultivisanim pod B LED svetlošću, oni su morfološki bili sitniji u poređenju sa malobrojnim somatskim embrionima koji su bili izloženi dejstvu FL i W LED svetlosti. Iz navedenih primera je jasno da postoji snažna veza između B svetlosti, auksina i GA i da može biti u korelaciji sa sticanjem embriogene kompetencije biljnih ćelija, međutim molekularni mehanizam koji leži u osnovi ove interakcije još uvek nije do kraja razjašnjen. Odgovor biljaka na B svetlost može biti tkivno-specifičan i u prirodi u mnogome zavisi od intenziteta i odnosa B i R svetlosti, ali i od biljne vrste (Folta & Childers, 2008).

5.11. Analiza endogenih giberelina

Kako rezultati dobijeni u prethodnom eksperimentu ukazuju da nivo endogenih GA u apikalnim odseccima korenova spanaća može imati važnu ulogu u procesu indukcije somatske embriogeneze, analiziran je sadržaj prekursora, bioaktivnih i neaktivnih metabolita GA u kontrolnim, neembriogenim i embriogenim eksplantatima kultivisanim *in vitro* tokom 24 h i 7 dana.

U kontrolnim eksplantatima, koji predstavljaju apikalne odsečke korenova intaktnih klijanaca, je detektovano prisustvo svih analiziranih GA, osim prekursora GA_{24} i GA_9 , bioaktivnog GA_6 i neaktivnog GA_{51} . U literaturi nema podataka o sadržaju GA u korenu spanaća, osim studije Kanan & Malkawi (2018), u kojoj je analizirana samo koncentracija GA_3 . Stoga, u ovom radu je po prvi put urađena analiza sadržaja GA u korenu spanaća, koja je pokazala da je put 13-hidroksilovanih GA dominantan u korenu, kao i u izdanku spanaća (Talon *et al.*, 1991b). U izdancima biljaka spanaća starih oko 8 nedelja detektovani su isti GA kao u korenu u okviru ove studije, ali i GA_9 i GA_{51} (Talon *et al.*, 1991b), koji nisu detektovani u korenovima spanaća. Bez obzira na odsustvo prekursora GA_{24} i GA_9 , u korenovima spanaća je detektovan GA_4 , kao i njegov metabolit GA_{34} , što znači da je i put 13-nehidroksilovanih GA prisutan u korenu. Tome slično, u izdancima spanaća nije bio detektovan neposredni prekursor GA_7 , bez obzira što je GA_7 bio prisutan u ekstraktu (Talon *et al.*, 1991b).

U ovoj studiji, koncentracija GA_4 u kontrolnim korenovima spanaća je bila 3.6 puta veća nego GA_1 . Međutim, koncentracija GA_{34} , koji nastaje inaktivacijom GA_4 , je bila 11 puta manja od koncentracije GA_8 , koji nastaje inaktivacijom GA_1 . To takođe ukazuje na intenzivniji metabolizam GA u okviru puta biosinteze GA 13-hidroksilacijom. Od bioaktivnih GA, u izdanku su detektovani još i GA_5 i GA_7 , dok GA_3 i GA_6 nisu detektovani (Talon *et al.*, 1991b). U ovoj studiji, u kontrolnim korenovima su detektovani GA_3 , GA_5 i GA_7 u vrlo niskim koncentracijama, dok GA_6 takođe nije detektovan. Verovatno je uzrok ovih razlika poboljšanje analitičkih metoda za detekciju GA, koje omogućavaju detekciju znatno niže količine GA nego pre nekoliko decenija.

U literaturi postoji vrlo mali broj studija u kojima je analiziran sadržaj GA u korenovima drugih biljnih vrsta (Zanewich & Rood, 1993; Smith *et al.*, 1992; Nojiri *et al.*, 1993; Olsen *et al.*, 1994; Yaxley *et al.*, 2001). Kao i u slučaju spanaća, kod najvećeg broja biljnih vrsta sadržaj endogenih GA je analiziran u nadzemnim biljnim organima, kao što su listovi, izdanci i cvetovi (Nielsen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012b; Rood *et al.*, 1989; Benson *et al.*, 1990; Shiraiwa *et al.*, 2012; Ayele *et al.*, 2010; Pimenta-Lange *et al.*, 2012; Arrom & Munné-Bosch, 2012). U korenovima biljaka crnog luka starih 4 nedelje od bioaktivnih GA su detektovani GA₄ i GA₁, s tim da je koncentracija GA₄ bila 3.65 puta veća nego GA₁ (Nojiri *et al.*, 1993), slično odnosu navedenih GA koji je dobijen u ovom radu. Kao i u korenovima spanaća, direktan prekursor GA₄ (GA₉) nije detektovan u korenu crnog luka, dok je neposredni prekursor GA₁ (GA₂₀) bio prisutan (Nojiri *et al.*, 1993). U korenovima uljane repe je detektovano prisustvo GA₂₀, GA₁₉, GA₁, ali ne i njegov produkt inaktivacije GA₈ (Zanewich & Rood, 1993). Suprotno tome, u lateralnim korenovima 12 dana starih biljaka graška detektovana je 1,5 puta veća količina GA₈ u poređenju sa GA₁. Pored toga, u korenovima graška je detektovano prisustvo GA₁₉, GA₂₀ i GA₂₉, dok GA₄ i GA₃ nisu bili prisutni (Yaxley *et al.*, 2001).

Kako GA predstavljaju zapanjujući veliku grupu jedinjenja, prisutne su varijacije u njihovoj zastupljenosti u zavisnosti od biljne vrste i analiziranog tkiva, s tim da je njihova količina veća u nadzemnim organima biljke u poređenju sa korenovima. U ovom radu su detektovane značajno niže koncentracije svih testiranih GA u korenu spanaća, nego u izdancima u okviru studije Talon *et al.* (1991b). Slično tome, značajno veća količina GA₁₉, GA₂₀ i GA₁ je detektovana u listovima, stabiljci i cvetovima uljane repe u poređenju sa korenovima (Zanewich & Rood, 1993), dok je u izdancima *Salix pentandra* zabeležena 12.5 odnosno 50 puta veća koncentracija GA₁ i GA₂₀ nego u korenovima (Olsen *et al.*, 1994).

U neembriogenim eksplantatima nisu uočene značajne promene u koncentraciji većine testiranih GA u odnosu na kontrolu. Jedino je koncentracija GA₂₀ bila 2.8 puta veća u odnosu na kontrolu, dok je koncentracija svih bioaktivnih GA bila tek neznatno veća u odnosu na kontrolu. Izuzetak je GA₃, čija se koncentracija povećala 22 puta 24 h od početka NAA tretmana. Međutim, njegova koncentracija se vratila na nivo tek neznatno veći od kontrole već tokom 7 dana.

Poznato je da auksini mogu da utiču na nivo endogenih GA, delujući na biosintezu i signalni put GA (Weiss & Ori, 2007; Ross *et al.*, 2000, 2003, 2011, 2016). Generalni efekat auksina je održavanje visokog nivoa endogenih GA, koje se odvija kroz stimulaciju ekspresije *GA20-ox* i *GA3-ox* i inhibiciju ekspresije *GA2-ox* (Ross *et al.*, 2000; Wolbang & Ross, 2001; Wolbang *et al.*, 2004; O'Neill *et al.*, 2010). Pokazano je da auksini kontrolišu rastenje korenova delujući i na signalni put GA, tako što utiču direktno na destabilizaciju DELLA proteina (Fu & Harberd, 2003). Za razliku od toga, u hipokotilu se stabilnost DELLA proteina povećava nakon tretmana auksinom i paklobutrazolom. Ovo ukazuje da auksini utiču na degradaciju DELLA proteina indirektno regulisanjem biosinteze GA (Chapman *et al.*, 2012). Na osnovu toga, O'Neill *et al.* (2010) su predložili model u kojem auksini stimulišu povećanje koncentracije bioaktivnih GA, što dovodi do degradacije DELLA proteina i pokretanja mehanizma negativne povratne sprege pomoću koje GA inhibiraju sopstvenu biosintezu.

U skladu sa navedenim, u ovarijumima ananasa, egzogena primena IAA je uticala na povećanje nivoa GA₂₀ i stimulisala je ekspresiju *GA20-ox2* i *GA3-ox1*, dok je uticala na smanjenje ekspresije *GA2-ox1* i smanjenje koncentracije GA₈ (Bermejo *et al.*, 2018). Slično tome, Weston *et al.* (2009) su pokazali da endogena IAA promoviše biosintezu GA u korenu graška, ali su međutim došli do zaključaka da supraoptimalni nivo egzogenog auksina ima obrnut efekat, povećavajući ekspresiju *PsGA2-ox* gena i smanjujući na taj način nivo bioaktivnih GA u korenu. Egzogena primena IAA, NAA i 2,4-D je uticala na smanjenje nivoa GA₁ i GA₄ tokom klijanja semena soje (Shuai *et al.*, 2017).

Navedeno ukazuje da endogeni auksini povećavaju nivo endogenih GA, ali da uticaj egzogenih auksina zavisi od primenjene koncentracije i fiziološkog procesa koji se prati. U skladu sa navedenim podacima iz literature, visoka koncentracija NAA primenjena na neembriogene eksplantate spanaća u okviru ove studije je izazvala najpre smanjenje ekspresije *SoGA20-ox1* i *SoGA3-ox1* tokom prvih 7 dana kultivacije eksplantata, što koincidira sa povećanjem nivoa endogenih GA, da bi se ekspresija ovih gena povećala u odnosu na kontrolu tek posle 14 dana kultivacije, što takođe koincidira sa povratkom nivoa endogenih bioaktivnih GA na nivo kontrole tokom 7 dana kultivacije na medijumu sa 20 μ M NAA (Sl. 25, 26). Ekspresija *SoGA2-ox2* gena je bila veća u embriogenim nego u kontrolnim eksplantatima tokom celokupnog trajanja eksperimenta (Sl. 28), dok je ekspresija *SoGA2-ox1* i posebno *SoGA2-ox3* gena bila niža u odnosu na kontrolu (Sl. 27, 29).

U embriogenim eksplantatima su uočene značajno veće promene u metabolizmu GA nego u neembriogenim eksplantatima. Dok je u neembriogenim eksplantatima došlo samo do neznatnog povećanja koncentracije prekursora bioaktivnih GA, koja se nije značajno menjala tokom kultivacije, u embriogenim eksplantatima je detektovano značajno povećanje koncentracije ovih GA (7.4-18.2 puta), koje se i posle 7 dana zadržalo na značajno većem nivou (6-11 puta) u odnosu na kontrolu (Tabela 15). Najveće razlike između embriogenih i neembriogenih eksplantata su bile u koncentraciji bioaktivnih GA. Koncentracije GA₁, GA₄ i GA₇ su se povećale samo 1.3-1.7 puta u neembriogenim i čak 843, 60, odnosno 136 puta u embriogenim eksplantatima u odnosu na kontrolu. U neembriogenim eksplantatima taj porast nivoa bioaktivnih GA se nije održao i posle 7 dana je bio približan kontroli, dok je u embriogenim eksplantatima koncentracija GA₁ nastavila da raste i posle nedelju dana kultivacije bila je 1054 puta veća u odnosu na kontrolu, a koncentracija GA₄ i GA₇ je bila 34, odnosno 57 puta veća od kontrole. Najveća promena koncentracije endogenih GA u celokupnoj analizi je bilo dramatično povećanje koncentracije GA₃ u embriogenim eksplantatima, 50 433 puta posle 24 h i 40 050 puta posle 7 dana.

Promene koncentracije proizvoda inaktivacije bioaktivnih GA su takođe bile neznatne u neembriogenim eksplantatima, za razliku od embriogenih eksplantata, u kojima je došlo do značajnog povećanja koncentracije GA₃₄, a posebno GA₈. Iz svega navedenog je jasno da se metabolizam GA u embriogenim eksplantatima odvija dominantno preko GA₁, slično izdanku (Talon *et al.*, 1991b), a suprotno intaktnim korenovima spanaća u kojima je detektovano 3.7 puta veća koncentracija GA₄ u odnosu na GA₁. Iz sveobuhvatne analize endogenih GA u ovoj studiji, jasno se uočava razlika između koncentracije prekursora, bioaktivnih GA i proizvoda njihove inaktivacije između embriogenih i neembriogenih eksplantata, koja se održava tokom vremena kultivacije.

Kod drugih biljnih vrsta je takođe zapažen snažan uticaj egzogene GA₃ na metabolizam GA. Egzogena primena GA₃ je uticala na povećanje količine endogenih GA u korenovima slatkog krompira (Singh *et al.*, 2019), cvetnim pupoljcima jabuke (Zhang *et al.*, 2016) i božura (Guan *et al.*, 2019), listovima *Camelia allifera* (Wen *et al.*, 2018) i šećerne trske (Qui *et al.*, 2019) i klijancima slatkog sirka (Forghani *et al.*, 2018). U korenovima biljaka slatkog krompira starih 2 nedelje, egzogena primena GA₃ je dovela do značajnog povećanja (više od 7 puta) u količini svih analiziranih bioaktivnih GA (GA₁, GA₃, GA₄ i GA₇) i povećanja od 17.2 puta količine GA₂₀ u poređenju sa kontrolom (Singh *et al.*, 2019). Slično tome, egzogena GA₃ je uticala na povećanje količine GA₁, GA₃, GA₄ i GA₇ u cvetnim pupoljcima jabuke, koje je bilo praćeno i smanjenjem ekspresije gena uključenih u biosintezu GA (*MdKO* i *MdGA20-ox*) (Zhang *et al.*, 2016). I u korenovima spanaća, uticaj GA₃ se ogledao u povećanju količine svih analiziranih GA, koje je posebno bilo izraženo u slučaju bioaktivnih GA, što je rezultiralo smanjenjem ekspresije *SoGA20-ox1* i *SoGA3-ox1* (Sl. 25, 26) i povećanjem ekspresije *SoGA2-ox1*, 2 i 3 (Sl. 27-29). Korelacija između povećanja količine endogenih GA i smanjenja ekspresije gena uključenih u biosintezu GA u embriogenim eksplantatima pod uticajem GA₃ se može

objasniti na sledeći način. Nakon što bi eksplantati usvojili GA₃ iz medijuma, visok nivo endogene GA₃ bi uticao na povećanje ostalih bioaktivnih GA, što bi uticalo na inhibiciju ekspresije gena uključenih u biosintezu GA mehanizmom negativne povratne sprege u cilju održavanja homeostaze GA. Iako je u ovom radu, ali i u prethodno navedenim studijama, nesumnjivo pokazano da egzogena GA₃ utiče na povećane količine bioaktivnih GA, ostaje nerazjašnjeno na koji način se to odvija. Singh *et al.* (2019) pretpostavljaju postojanje mogućnosti konverzije GA₃ u druge bioaktivne GA. Na primer, pokazano je da GA₄ može da se konvertuje u GA₁ hidroksilacijom na C-13, C-2 ili C-16 atomu (Durley & Pharis, 1973), međutim mehanizam konverzije GA₃ u druge bioaktivne GA do sada nije poznat.

Iako je uočeno povećanje svih bioaktivnih GA u embriogenim eksplantatima, najveća količina je detektovana u slučaju GA₃ koja je bila oko 229 puta odnosno 60 puta veća od količine GA₄ i GA₁ već nakon 24 h. Slično tome, najveće povećanje u količini GA₃ je detektovano u korenovima slatkog krompira u poređenju sa ostalim bioaktivnim GA (Singh *et al.*, 2019). Ovako drastično velike količine GA₃ koje su detektovane u embriogenim eksplantatima se mogu objasniti njegovom većom stabilnošću u poređenju sa drugim bioaktivnim GA. GA₃ sadrži C1-C2 dvostruku vezu, koja onemogućava 2-β hidroksilaciju, što ukazuje da GA₃ ne predstavlja supstrat za enzim GA2-ox i ne podleže ovakom tipu inaktivacije kao GA₁ i GA₄ (Nakayama *et al.*, 1990; Sponsel & Hedden, 2010). Upravo zbog ovakve hemijske strukture, GA₃ ima veću stabilnost, ali i biološku aktivnost u poređenju sa GA₁ i GA₄ (Sponsel & Hedden, 2010). Pored toga, pokazano je da GA₃ ne predstavlja supstrat ni za enzim P450 mono-oksigenazu (CYP714D1), koji epoksidacijom inaktivira GA₁₂, GA₉ i GA₄ prevodiće ih u 16α,17-epokside (Zhu *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2011). Ipak, u cilju održavanja homeostaze GA, biljke moraju da poseduju mehanizam inaktivacije GA₃. I zaista u ovom radu je uočeno smanjenje količine GA₃ nakon 7 dana u poređenju sa prva 24 h trajanja eksperimenta, što ukazuje da je u korenovima spanaća došlo do nekog vida inaktivacije GA₃. U skladu sa tim, pokazano je da GA₃ može da se inaktivira konjugacijom sa šećerima (Asakawa *et al.*, 1974; Liebisch *et al.*, 1974; Knöfel *et al.*, 1984; Schliemann *et al.*, 1993; Stephan *et al.*, 2001). Konjugacija GA sa šećerima (najčešće glukozom) predstavlja jedan od mehanizama inaktivacije kojim podleže većina GA metabolita (prekursori, bioaktivni i neaktivni) prilikom čega u zavisnosti od mesta vezivanja glukoze nastaju glikozil-etri ili glikozil-estri (Schneider & Schlieman, 1994; Nadeau & Rapaport, 1974; Moritz *et al.*, 1990). U slučaju GA₃ je pokazano da se on konvertuje u glikozil-etar (GA₃-13-O-glikozid) u plodovima jabuke (Stephan *et al.*, 2001), dok u plodovima *Phaseolus coccineus* GA₃ predstavlja supstrat za enzim glikoziltransferazu koji koristi UDP-glukozu kao donor šećera, prilikom čega nastaje glikozil-estar (GA₃-3-O-glikozid) (Knöfel *et al.*, 1984; Schliemann *et al.*, 1993). Pojedini konjugovani oblici GA imaju biološku aktivnost u biljkama, međutim navedeni glikozilni-etri i glikozilni-estri GA₃ su neaktivni metaboliti (Schneider & Schliemann, 1994). Kako je konjugacija GA sa šećerima reverzibilna reakcija, moguća uloga neaktivnih konjugovanih oblika je da na brz način obezbede veću količinu biološki aktivnih GA kada je biljci to potrebno (Schneider & Schliemann, 1994; Senns *et al.*, 1998). Iako konjugacija GA sa glukozom predstavlja vrlo potentan mehanizam inaktivacije GA koji je bio intezivno izučavan sve do devedesetih godina, nakon toga gotovo da nema publikacija na ovu temu (Hedden, 2020).

Zanimljivo je da su eksplantati sličnim mehanizmom reagovali na primenu egzogenih NAA i NAA+GA₃. U oba slučaja je došlo do značajnog povećanja koncentracije endogene GA₃, ali je nivo ovog hormona bio značajno veći i dugotrajniji pri istovremenoj primeni NAA i GA₃. To ukazuje i na moguće postojanje praga osetljivosti biljnog tkiva prema promeni koncentracije endogene GA₃, jer je egzogena primena NAA izazvala samo kratkotrajan skok endogene GA₃, bez značajnog povećanja ostalih bioaktivnih GA. Nasuprot tome, istovremeni uticaj egzogene NAA i GA₃ je izazvao značajno

veći i dugotrajniji skok GA₃, koji se reflektovao uticajem na značajno povećanje nivoa ostalih endogenih bioaktivnih GA.

Jedan od ilustrativnih primera kompleksnog uticaja bioaktivnih GA se ogleda u njihovoj dvostrukoj ulozi (aktivaciji i inhibiciji) u grananju višegodišnjih izdanaka hibridne topole (Katyayini *et al.*, 2020). Tokom formiranja apikalnog pupoljka hibridne topole dolazi do povećane akumulacije GA₃ i GA₆, koja stimuliše ekspresiju *GA2-ox* gena. Povećana ekspresiju *GA2-ox* gena utiče na inaktivaciju GA₁ i GA₄ usled čega njihov nivo opada i grananje izdanaka je inhibirano. Dekapitacijom apikalnog pupoljka, količina GA₃ i GA₆ opada, ekspresija *GA2-ox* gena je inhibirana, što za posledicu ima povećanje količine GA₁ i GA₄ i stimulaciju grananja izdanaka (Katyayini *et al.*, 2020). Navedeni primeri ukazuje da GA pokretanjem različitih mehanizama, mogu imati različite uloge u zavisnosti od faze razviće biljaka i fiziološkog procesa.

Kao što je već pomenuto, povećanje količine endogenih GA u embriogenim eksplantatima pokreće mehanizam negativne povratne sprege kojim se inhibira ekspresija gena uključenih u biosintezu GA, međutim to verovatno nije jedini mehanizam njihovog delovanja. Pokazano je da tokom razvića semena, povećanje količine endogenih GA indukuje ekspresiju *LEC1* gena koji pozitivno reguliše nekoliko aspekata tokom razvića embriona i endosperma (Hu *et al.*, 2018a). Na kotiledonarnom stadijumu zigotskih embriona *A. thaliana* detektovano je povećanje GA₁, GA₃ i GA₄ koje je bilo u korelaciji sa povećanom aktivnošću *LEC1* transkripcionog faktora. Uticaj povećane količine bioaktivnih GA je u destabilizaciji *DELLA* proteina, glavnog represora signalnog puta GA, za koji je pokazano da intereagije za *LEC1* transkripcionim faktorom onemogućavajući njegovu aktivnost. Na ovaj način GA oslobađaju *LEC1* represije koji onda indukuje ekspresiju gena uključenih u biosintezu auksina (*YUCCA*) koji su neophodni za normalno razviće embriona (Hu *et al.*, 2018a). Kako je poznato i da ektopična ekspresija *LEC1* gena efikasno indukuje somatsku embriogenezu, promovišući biosintezu auksina (Stone *et al.*, 2008; Wójcikowska & Gaj, 2015), moguće je da povećanje količine endogenih GA tokom indukcije ovog procesa, ima isti uticaj na ekspresiju *LEC1* kao i tokom razvića semena. Suprotno tome, nakon klijanja semena, GA utiču na degradaciju *DELLA* proteina, čime se stimuliše aktivnost *PKL* transkripcionog faktora koji inhibira ekspresiju gena uključenih u embriogenezu, kako bi se stimulisalo vegetativno razviće (Ogas *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2014).

Sa aspekta somatske embriogeneze takođe je uočena korelacija između povećanja količine endogenih GA i indukcije ovog procesa (Jiménez & Bangerth, 2001b; Jiménez *et al.*, 2005; Igielski & Kępczyńska, 2017; Kępczyńska & Orłowska, 2021). U listovima embriogene i neembriogene linije *Medicago truncatula* detektovani su svi metaboliti GA (prekursori, bioaktivni i neaktivni metaboliti) puta 13-nehidroksilovanih i 13-hidroksilovanih GA tokom 3 nedelje indukcionog perioda, s tim da su se količine pojedinih metabolita razlikovale u pomenutim linijama (Igielski & Kępczyńska, 2017; Kępczyńska & Orłowska, 2021). Već nakon 7 dana indukcionog perioda, detektovano je značajno povećanje u količini prekursora GA₅₃ i GA₁₉, što je bilo praćeno i značajnim povećanjem količine bioaktivnih GA (GA₁, GA₃ i GA₆) u embriogenoj liniji u poređenju sa neembriogenom linijom *M. truncatula* (Igielski & Kępczyńska, 2017; Kępczyńska & Orłowska, 2021). Slično tome, u embriogenim kalusima kukuruza uočena je veća akumulacija GA₂₀, GA₁ i GA₃, nego u neembriogenim kalusima (Jiménez & Bangerth, 2001b). Kao i u embriogenim eksplantatima spanaća, najzastupljeniji bioaktivni GA u embriogenoj liniji *M. truncatula* je bio GA₃, zbog čega autori smatraju da je povećanje količine ovog metabolita bilo ključno za sticanje embriogene kompetencije ćelija (Kępczyńska & Orłowska, 2021). Nasuprot rezultatima dobijenim u ovom radu, nisu detektovane značajne razlike u količini bioaktivnih GA₄ i GA₇, kao i produkta inaktivacije GA₃₄ i GA₈ tokom

indukcije somatske embriogeneze kod *M. truncatula* (Kępczyńska & Orłowska, 2021) i kukuruza (Jiménez & Bangerth, 2001b).

Kako uloga GA u indukciji somatske embriogeneze može biti stimulatívna ili inhibitorna u zavisnosti od biljne vrste, uočene su različite potrebe ćelija za količinom endogenih GA prilikom sticanja embriogene kompetencije. Za razliku od gorepomenutih primera, smanjenje u količini GA₁ i povećanje katabolizma GA je bilo u korelaciji sa indukcijom somatske embriogeneze kod *Pimpinella anisum* i *Daucus carota* (Noma *et al.*, 1982). Zanimljivo je istaći činjenicu da je razviće somatskih embriona šargarepe direktno iz eksplantata stimulisano smanjenjem količine endogenih GA (Tokuji & Kuriyama, 2003), dok je indirektna indukcija somatske embriogeneze kod ove biljne vrste favorizovana povećanjem nivoa endogenih GA (Mitsuhashi *et al.*, 2003). Navedeni rezultati ukazuju na važnu ulogu endogenih GA u indukciji somatske embriogeneze i da bi varijacije u njihovoj količini mogle predstavljati glavni uzrok genetičke varijabilnosti u pogledu regeneracije kod mnogih biljnih vrsta, čak i u okviru iste vrste u zavisnosti od načina indukcije somatske embriogeneze (direktno ili indirektno).

Uzimajući u obzir celokupne rezultate ekspresije gena i analize endogenih GA, može se zaključiti da su eksplantati izloženi dejstvu 20 µM NAA bili u stanju da već posle nedelju dana povrate homeostazu GA, tj. da se vrate na stanje približno eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR, bez obzira na stalno prisustvo NAA u medijumu. Verovatno je tome doprinelo smanjenje ekspresije gena koji kodiraju anaboličke enzime i povećanje ekspresije gena koji kodiraju kataboličke enzime. Međutim, posle 14 dana, ekspresija ovih gena je bila na nivou kontrole, tj. eksplantata kultivisanih na medijumu bez BRR (Sl. 25). To ukazuje da su drugi pokrenuti mehanizmi doprineli daljoj stabilizaciji endogenih GA. Zanimljivo je da je u eksplantatima kultivisanim na medijumu sa GA₃ već posle 7 dana ekspresija *SoGA20-ox1* bila približna ekspresiji ovog gena u eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR (Sl. 25), verovatno zahvaljujući konstantnom smanjenju ekspresije *SoGA3-ox1* (Sl. 26) i povećanju ekspresije *SoGA2-ox1* (Sl. 27). Za razliku od prethodnih, u eksplantatima kultivisanim u prisustvu NAA+GA₃, nivo endogenih GA je ostao vrlo visok i posle 7 dana, što ukazuje da oni nisu bili u stanju da povrate homeostazu GA, pa je ekspresija gena koji kodiraju anaboličke enzime tokom 28 dana bila značajno niža i od kontrolnih korenova i od eksplantata kultivisanih na medijumu bez BRR.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da:

1. Semena sorte „Matador“ proizvedena u različitim evropskim kompanijama ispoljavaju velike razlike u pogledu brzine i frekvence klijanja, kao i brzine razvića klijanaca. Ove razlike se mogu pripisati genetičkom faktoru, različitim klimatskim uslovima pod kojima su gajene majke-biljke, stadijumu zrelosti semena u momentu branja i uslovima njihovog skladištenja.
2. Embriogeni potencijal eksplantata je pokazao veliku varijabilnost između populacija i individua u okviru populacije. Navedeno ukazuje da odabir biljnog materijala za eksperiment može dovesti do pogrešne interpretacije rezultata, usled odabira jedinki sa većim embriogenim potencijalom za jedan tretman, a sa manjim embriogenim potencijalom za drugi tretman.
3. Ustanovljena je metoda uzorkovanja biljnog materijala izlaganjem jednakog broja odsečaka korenova svakog klijanca svim tretmanima u okviru eksperimenta, čime je prevaziđena varijabilnost biljnog materijala usled genetičkih i drugih uticaja.
4. Adekvatnost metode uzorkovanja biljnog materijala potvrđena je dvema metodama kvantifikacije embriogenog potencijala: ekspresijom marker gena *SoRIP2* i konvencionalnim brojanjem somatskih embriona pomoću binokulara.
5. Somatski embrioni imaju višćelijsko poreklo i potiču iz ćelija pericikla i parenhima koji su povezani sa vaskularnim tkivom korena spanaća.
6. GA₃ i PAC pojedinačno ne izazivaju proliferaciju tkiva korena niti *de novo* regeneraciju.
7. NAA indukuje značajnu proliferaciju ćelija korena i zanemarljivu frekvencu regeneracije somatskih embriona iz eksplantata nasumično izabranih klijanaca (0.42%). NAA može indukovati značajniji embriogeni odgovor samo iz eksplantata jedinki koje su genetički predisponirane prema procesu somatske embriogeneze.
8. NAA+GA₃ indukuju ograničenu proliferaciju ćelija eksplantata i efikasnu somatsku embriogenezu iz korenova spanaća.
9. PAC, NAA i GA₃ sinergistički deluju na indukciju somatske embriogeneze iz odsečaka korenova spanaća. PAC u kombinaciji sa NAA+GA₃ utiče na značajno povećanje broja SE, sa najvećim dejstvom pri 2.5 μM PAC.
10. U kombinaciji sa NAA, PAC može izazvati približan embriogeni odgovor eksplantata kao GA₃. Za dostizanje embriogenog odgovora indukovano delovanjem NAA+ GA₃, kod eksplantata

nasumično izabranih klijanaca potrebno je kombinovati 20 μM NAA sa 10 μM PAC, a kod jedinki sa visokim embriogenim potencijalom 5 μM PAC.

11. TSA ne može da zameni NAA ni GA_3 u indukciji somatske embriogeneze iz lateralnih korenova spanaća. TSA u kombinaciji sa 10 μM NAA + 5 μM GA_3 značajno utiče na povećanje embriogenog potencija, bez obzira na primenjenu koncentraciju, ali samo pri dužim tretmanima u trajanju od 7 ili 14 dana. U kombinaciji sa većom koncentracijom NAA (20 μM NAA + 5 μM GA_3) za sličan embriogeni odgovor je potreban kraći TSA tretman (1 ili 7 dana). DMSO značajno utiče na povećanje embriogenog potencijala eksplantata, verovatno utičući na povećanje propustljivosti plazmaleme prema NAA i GA_3 .
12. Plava LED svetlost najefikasnije deluje na indukciju somatske embriogeneze iz odsečaka korenova spanaća. W LED i FL svetlost su značajno manje efikasne, dok je somatska embriogeneza inhibirana u uslovima mraka i crvene LED svetlosti.
13. U embriogenim eksplantatima, kultivisanim na medijumu sa NAA+ GA_3 detektovano je konstantno smanjenje ekspresije gena koji kodiraju enzime uključene u biosintezu GA (*SoGA20-ox1* i *SoGA3-ox1*) i povećanje ekspresije gena koji kodiraju enzime uključene u katabolizam GA (*SoGA2-ox*).
14. Najveće razlike između embriogenih eksplantata (kultivisanih na medijumu sa (NAA+ GA_3), i neembriogenih eksplantata (kultivisanih na medijumu bez BRR ili na medijumu sa GA_3 ili NAA) su detektovane u ekspresiji *SoGA20-ox1* i *SoGA2-ox2* gena.
15. Povećanje ekspresije *SoGA20-ox1* u odnosu na kontrolu (korenove intaktnih klijanaca) je nastupilo ranije u neembriogenim eksplantatima (24 h i 7 dana u eksplantatima kultivisanim na medijumu bez BRR, odnosno sa 5 μM GA_3), nešto kasnije u eksplantatima sa vrlo niskim embriogenim potencijalom, kultivisanim na medijumu sa 20 μM NAA (14 dana), dok je u embriogenim eksplantatima, kultivisanim na medijumu sa NAA+ GA_3 , ekspresija ovog gena tokom celokupnog perioda indukcije SE bila značajno niža u odnosu na kontrolu.
16. Profil ekspresije gena koji kodiraju ključne enzime za metabolizam GA je sličan u eksplantatima kultivisanim na medijumu sa NAA+PAC, NAA+ GA_3 i NAA+PAC+ GA_3 , što ukazuje da PAC verovatno stimuliše somatsku embriogenezu kod spanaća nekim drugim mehanizmom koji ne podrazumeva promene na nivou ekspresije navedenih gena.
17. Profil ekspresije *GA-ox* gena u eksplantatima kultivisanih u prisustvu NAA+ GA_3 pod FL svetlošću je bio značajno različit u odnosu na odsečke korenova kultivisane na medijumu bez BRR pod istom svetlošću, dok u eksplantatima kultivisanim u uslovima B, W LED i FL svetlosti nisu uočene značajne promene u ekspresiji pomenutih gena. Navedeno ukazuje da

prisustvo svetlosti ima manji uticaj na ekspresiju *GA-ox* gena od povratne sprege za održanje homeostaze GA pokrenute egzogenim NAA+GA₃.

18. Analiza sadržaja endogenih GA, urađena po prvi put u korenovima spanaća, je pokazala da je u korenu spanaća dominantan put biosinteze 13-hidroksilovanih GA.
19. U kontrolnim korenovima spanaća, od bioaktivnih GA je bio najzastupljeniji GA₄, mada značajna količina GA₈, ukazuje na intenzivan metabolizam GA₁. Ostali bioaktivni GA su bili prisutni u vrlo niskim koncentracijama.
20. U neembriogenim eksplantatima, kultivisanim na medijumu sa NAA, nisu uočene značajne promene u koncentraciji većine testiranih GA u odnosu na kontrolu, osim GA₃, čija je koncentracija kratkotrajno (24 h) bila veća (22 puta) od kontrole.
21. U embriogenim eksplantatima, kultivisanim na medijumu sa NAA+GA₃, je detektovano značajno povećanje koncentracije prekursora bioaktivnih GA, koje se i posle 7 dana zadržalo na značajno većem nivou u odnosu na kontrolu. Koncentracije bioaktivnih GA₃, GA₁, GA₄ i GA₇ su se povećale 50 433, 843, 60, odnosno 136 puta posle 24 h. Posle 7 dana tretmana, koncentracija je GA₁ nastavila da raste (1054 puta veća u odnosu na kontrolu), dok su koncentracije GA₃, GA₄ i GA₇ bile 40 050, 34, odnosno 57 puta veće od kontrole.
22. U embriogenim eksplantatima GA₃ je uticao na povećanje količine svih bioaktivnih GA, usled čega je došlo do inhibicije ekspresije anaboličkih gena i stimulacije ekspresije kataboličkih gena mehanizmom povratne sprege u cilju održavanja homeostaze GA.
23. Navedeno ukazuje da je drastično povećanje u količini GA₃ u korelaciji sa sticanjem embriogenog potencijala apikalnih odsečaka korenova spanaća.

7. LITERATURA

- Abbasi A, Shekari F, Mustafavi SH (2015) Effect of paclobutrazol and salicylic acid on antioxidants enzyme activity in drought stress in wheat. *Idesia* 33: 5-13.
- Abohatem MA, Bakil Y, Baaziz M (2017) Plant regeneration from somatic embryogenic suspension cultures of date palm. In: Al-Khayri JM, Jain S, Johnson D (eds.) *Date palm biotechnology protocols*, Vol. 1. Springer, New York, USA, pp. 203-214.
- Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP (2003) Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* 15: 2816-2825.
- Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster GT, Genschik P (2009) Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 19: 1188-1193.
- Acheampong AK, Hu J, Rotman A, Zheng C, Halaly T, Takebayashi Y, Jikumaru Y, Kamiya Y, Lichter A, Sun TP, Or E (2015) Functional characterization and developmental expression profiling of gibberellin signalling components in *Vitis vinifera*. *J Exp Bot* 66: 1463-1476.
- Ahmad NBH, Abbasi H, Fazal MA, Khan MSA (2014) Effect of reverse photoperiod on *in vitro* regeneration and piperine production in *Piper nigrum* L. *CR Biologies* 337: 19-28.
- Ait-Ali T, Frances S, Weller JL, Reid JB, Kendrick RE, Kamiya Y (1999) Regulation of gibberellin 20-oxidase and gibberellin 3 β hydrixilase transcript accumulation during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiol* 121: 783-791.
- Akula A, Akula C, Bateson MF (2000) Betaine a novel candidate for rapid induction of somatic embryogenesis in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Plant Growth Regul* 30: 241-246.
- Alabadí D, Gallego-Bartolomé J, Orlando L, Garcia-Cárcel L, Rubio V, Martínez, C, Frigerio M, Iglesias-Pedraz JM, Espinosa A, Deng XW, Blázquez MA (2008) Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent *Arabidopsis* seedling de-etiolation in darkness. *Plant J* 53: 324-335.
- Alam N, Anis M, Javed S, Bin Alatar AA (2020) Stimulatory effect of copper and zinc sulphate on plant regeneration, glutathione-S-transferase analysis and assessment of antioxidant activities in *Mucuna pruriens* L. (DC). *Plant Cell Tiss Org Cult* 141: 155-166.
- Albany NR, Vilchez JA, Garcia L, Jiménez E (2005) Comparative study of morphological parameters of Grand Nain banana (*Musa AAA*) after *in vitro* multiplication with growth retardants. *Plant Cell Tiss Org Cul* 83: 357-361.
- Alejandri-Ramírez ND, Chávez-Hernández EC, Contreras-Guerra JL, Reyes JL, Dinkova TD (2018) Small RNA differential expression and regulation in *Tuxpeno* maize embryogenic callus induction and establishment. *Plant Physiol Biochem* 122: 78-89.
- Al-Khayri JM, Huang FH, Morelock TE, Busharar TA, Gbur EE (1991a) Genotype – dependent response of spinach cultivars to *in vitro* callus induction and plant regeneration. *Plant Sci* 78: 121-126.
- Al-Khayri JM, Huang FH, Morelock TE (1991b) Regeneration of spinach from leaf callus. *Hort Sci* 26: 913-914.
- Al-Khayri JM, Huang FH, Morelock TE (1991c) Micropagation of spinach. *Arkansas Farm Res* 40: 7.

- Al-Khayri JM, Huang FH, Morelock TE (1991d) *In vitro* flowering in regenerated shoots of spinach. Hort Sci 26: 1422.
- Al-Khayri JM, Huang FH, Morelock TE, Busharar TA (1992a) Stimulation of shoot regeneration in spinach callus by gibberellic acid. Hort Sci 27: 1046.
- Al-Khayri J, Huang F, Morelock T, Busharar T (1992b) Spinach tissue culture improved with coconut water. Hort Sci 27: 357-358.
- Al-Khayri JM (1997) Micropropagation of *Spinacia oleracea* L. (Spinach). In: Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 39: High tech and micropropagation. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 173-200.
- Al-Khayri JM (2001) Optimization of biotin and thiamine requirements for somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). In Vitro Cell Dev Biol Plant 37: 453-456.
- Al-Mayahi AMW (2016) Effect of red and blue light emitting diodes “CRB-LED” on *in vitro* organogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Alshakr. World J Microbiol Biotechnol 32:160.
- Almeida FA, Vale EM, Ries RS, Santa-Catarina C, Silveira V (2019) LED lamps enhance embryo maturation in association with the differential accumulation of proteins in *Carica papaya* L. ‘Gilden’ embryogenic callus. Plant Physiol Biochem 143: 109-118.
- An F, Zhang X, Zhu Z, Ji Y, He W, Jiang Z, Li M, Guo H (2012) Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated *Arabidopsis* seedlings. Cell Res 22: 915-927.
- Anami SE, Mgtutu AJ, Taracha C, Coussens G, Karimi M, Hilson P, Van Lijsebettens M, Machuka J (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration of tropical maize genotypes. Plant Cell Tiss Org Cult 102: 285-295.
- Anderson JV, Chao SW, Horwath DP (2001) A current review on the regulation of dormancy in vegetative buds. Weed Sci 49: 581-589.
- Andersen SB, Torp AM (2011) Spinacia. In: Kole C (ed.) Wild crop relatives: genomic and breeding resources vegetables. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 273-276.
- Andreae WA, Good NE (1955) The formation of indole acetyl aspartic acid in pea seedlings. Plant Physiol 30: 380-382.
- Appleford NEJ, Lenton JR (1991) Gibberellins and leaf expansion in near isogenic wheat lines containing *rht1* and *rht3* dwarfing alleles. Planta 183: 229-236.
- Armstrong CL, Romero-Severson J, Hodges TK (1992) Improved tissue culture response of an elite maize inbred through backcross breeding, and identification of chromosomal regions important for regeneration by RFLP analysis. Theor Appl Genet 84: 755-762.
- Arrom L, Munné-Bosch S (2012) Hormonal changes during flower development in floral tissues of *Lilium*. Planta 236: 343-354.
- Asakawa Y, Tamari K, Shoji A, Kaji J (1974) Metabolic products of gibberellin A₃ and their interconversion in dwarf kidney bean plants. Agric Biol Chem 38: 719-725.

- Asamo Y, Katsumoto H, Inokuma C (1996) Cytokinin and thiamin requirements and stimulative effects of riboflavin and a ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *Zoysia japonica* Steud. *J Plant Physiol* 149: 413-417.
- Asare-Boamah NK, Hofstra G, Fletcher RA, Dumbroff EB (1986) Triadimefon protect bean plants from water stress through its effect on abscisic acid. *Plant Cell Physiol* 27: 383-390.
- Ascencio-Cabral A, Gutiérrez-Pulido, H, Rodríguez-Garay B, Gutiérrez-Mora A (2008) Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. *Sci Hortic* 118: 155-160.
- Asthana P, Rai MK, Jaiswal U (2017) Somatic embryogenesis from sepal explants in *Sapindus trifoliatus*, a plant valuable in herbal soap industry. *Ind Crops Prod* 100: 228-235.
- Atta R, Laurens L, Boucheron-Dubuisson E, Guivarc'h A, Carnero E, Giraudat-Pautot V, Rech P, Chriqui D (2009) Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. *Plant J* 57: 626–644.
- Awada R, Campa C, Gibault E, Déchamp E, Georget F, Lepelley M, Abdallah C, Erban A, Seidel M, Kopka J, Legendre L, Lérant S, Conéjéro G, Verdeil JL, Crouzillat D, Breton D, Bertrand B, Etienne H (2019) Unravelling the metabolic and hormonal machinery during key steps of somatic embryogenesis: a case study in coffee. *Int J Mol Sci* 20: 4665.
- Awada R, Verdier D, Froger S, Brulard E, de Faria Maraschin S, Etienne H, Breton D (2020) An innovative automated active compound screening system allows high-throughput optimization of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Sci Rep* 10: 810.
- Awadh HAA, Abdulhusein MAA, Almusawi AHA (2019) Effects of paclobutrazol and sucrose in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) micropropagation via direct organogenesis. *Plant Arch* 19: 1130-1134.
- Awasthi P, Sharma V, Kaur N, Kaur N, Pandey P, Tiwari S (2017) Genome-wide analysis of transcription factors during somatic embryogenesis in banana (*Musa spp.*) cv. Grand naine. *PLoS One* 12: e0182242.
- Ayele BT, Magnus V, Mihaljević S, Prebeg T (2010) Endogenous gibberellin profile during Christmas rose (*Helleborus niger* L.) flower and fruit development. *J Plant Growth Regul* 29: 194-209.
- Ayil-Gutiérrez B, Galaz-Ávalos RM, Peña-Cabrera E, Loyola-Vargas VM (2013) Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signal Behav* 8: e26998.
- Bai MY, Shang JX, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun TP, Wang ZY (2012) Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol* 14: 810-817.
- Bairu MW, Stirk WA, Doležal K, Van Staden J (2007) Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell Tiss Org Cult* 90: 15-23.
- Ballaré CL, Pierik R (2017) The shade avoidance syndrome: multiple signals and ecological consequences. *Plant Cell Environ* 40: 2530-2543.

- Band LR, Úbeda-Tomás S, Dyson RJ, Middleton AM, Hodgman TC, Owen MR, Jensen OE, Bennett MJ, King JR (2012) Growth-induced hormone dilution can explain the dynamics of plant root cell elongation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 7577-7582.
- Banerjee A, Roychoudhury A (2019) The regulatory signaling of gibberellin metabolism and its crosstalk with phytohormones in response to plant abiotic stresses. In: Khan MIR, Reddy PS, Ferrante A, Khan NA (eds.) *Plant signaling molecules. Role and regulation under stressful environments*. Woodhead Publishing (Elsevier), Cambridge, UK. pp. 333-339.
- Baninasab B, Ghobadi C (2011) Influence of paclobutrazol and application methods on high-temperature stress injury in cucumber seedlings. *J Plant Growth Regul* 30: 213-219.
- Bao JH, Chin DP, Fukami M, Ugaki M, Nomura M, Mii M (2009) *Agrobacterium*-mediated transformation of spinach (*Spinacia oleracea*) with *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance against two common vegetable pests. *Plant Biotechnol* 26: 249-254.
- Bao S, Hua C, Shen L, Yu H (2020) New insights into gibberellin signaling in regulating flowering in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* 62: 118-131.
- Barbosa IC, Zourelidou M, Willige BC, Weller B, Schwechheimer C (2014) D6 PROTEIN KINASE activates auxin transport-dependent growth and PIN-FORMED phosphorylation at the plasma membrane. *Dev Cell* 29: 674-685.
- Barker R, Garcia MNF, Powers SJ, Vaughan S, Bennett MJ, Phillips AL, Thomas SG, Hedden P (2020) Mapping sites of gibberellin biosynthesis in the *Arabidopsis* root tip. *New Phytol* 229: 1521-1534.
- Barneche F, Malapeira J, Mas P (2014) The impact of chromatin dynamics on plant light responses and circadian clock function. *J Exp Bot* 65: 2895-2913.
- Barro F, Martin A, Lazzeri P, Barcelo P (1999) Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. *Euphytica* 108: 161-167.
- Becker MG, Chan A, Mao X, Girard IJ, Lee S, Elhiti M, Stasolla C, Belmonte MF (2014) Vitamin C deficiency improves somatic embryo development through distinct gene regulatory networks in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 65: 5903-5918.
- Belić M, Zdravković-Korać S, Uzelac B, Čalić D, Pavlović S, Milojević J (2020a) Variability in somatic embryo-forming capacity of spinach. *Sci Rep* 10: 19290.
- Belić M, Zdravković-Korać S, Janošević D, Savić J, Todorović S, Banjac N, Milojević J (2020) Gibberellins and light synergistically promote somatic embryogenesis from the *in vitro* apical root sections of spinach. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 142: 537-548.
- Bello Bello JJ, Pérez-Sato JA, Cruz Cruz CA, Martínez Estrada E (2017) Light emitting diodes: Progress in plant micropropagation. *InTech* 6: 93-103.
- Benschop JJ, Jackson MB, Guhl K, Vreeburg RAM, Croker, SJ, Peeters AJM, Voeselek LACJ (2005) Contrasting interactions between ethylene and abscisic acid in *Rumex* species differing in submergence tolerance. *Plant J* 44: 756-768.
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591-602.

- Benson RJ, Beall FD, Mullet JE, Morgan PW (1990) Detection of endogenous gibberellins and their relationship to hypocotyl elongation in soybean seedlings. *Plant Physiol* 94: 77-84.
- Benson EE (2000) *In vitro* plant recalcitrance, an introduction. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36: 141-148.
- Berdasco M, Alcázar R, García-Ortiz MV, Ballestar E, Fernández AF, Roldán-Arjona T, Tiburcio AF, Altabella T, Buisine N, Quesneville H, Baudry A, Lepiniec L, Alaminos M, Rodríguez R, Lloyd A, Colot V, Bender J, Canal MJ, Esteller M, Fraga M (2008) Promoter DNA hypermethylation and gene repression in undifferentiated *Arabidopsis* cells. *PLoS One* 3: e3306.
- Berenguer E, Bárány I, Solís M-T, Pérez-Pérez Y, Risueño MC, Testillano PS (2017) Inhibition of histone H3K9 methylation by BIX-01294 promotes stress-induced microspore totipotency and enhances embryogenesis initiation. *Front Plant Sci* 8: 1161.
- Bermejo A, Granero B, Mesejo C, Reig C, Tejado V, Agustí M, Primo-Millo E, Iglesias DJ (2018) Auxin and gibberellin interact in citrus fruit set. *J Plant Growth Regul* 37: 491-501.
- Bernula D, Benkő P, Kaszler N, Domonkos I, Valkai I, Szöllősi R, Ferenc G, Ayaydin F, Fehér A, Gémes K (2020) Timely removal of exogenous cytokinin and the prevention of auxin transport from the shoot to the root affect the regeneration potential of *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Tiss Org Cult* 140: 327-339.
- Bhattacharya A, Ward DA, Hedden P, Phillips AL (2012) Engineering gibberellin metabolism in *Solanum nigrum* L. by ectopic expression of gibberellin oxidase genes. *Plant Cell Rep* 31: 945-953.
- Biddington NL, Sutherland RA, Robinson HT (1992) The effects of gibberellic acid, fluridone, abscisic acid, and paclobutrazol on anther culture of brussels sprouts. *Plant Growth Regul* 11: 81-84.
- Bie XM, Dong L, Li XH, Wang H, Gao XQ, Li XG (2020) Trichostatin A and sodium butyrate promotes plant regeneration in common wheat. *Plant Signal Behav* 15: 1820681.
- Binenbaum J, Weinstain R, Shani E (2018) Gibberellin localization and transport in plants. *Trends Plant Sci* 23: 410-421.
- Birhman RK, Laublin G Cappadocia M (1994) Genetic control of *in vitro* shoot regeneration from leaf explants in *Solanum chacoense* Bitt. *Theor Appl Genet* 88: 535-540.
- Björklund AS, Antti H, Uddestrand I, Moritz T, Sundberg B (2007) Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. *Plant J* 52: 499-511.
- Blazquez S, Olmos E, Hernández JA, Fernández-García N, Fernández JA, Piqueras A (2009) Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell Tiss Org Cult* 97: 49-57.
- Boccaccini A, Santopolo S, Capauto D, Lorrain R, Minutello E, Serino G, Costantino P, Vittorioso P (2014) The DOF protein DAG1 and the DELLA protein GAI cooperate in negatively regulating the *AtGA3ox1* gene. *Mol Plant* 7: 1486-1489.

- Boccacci P, Mela A, Pavez Mina C, Chitarra W, Perrone I, Gribaudo I, Gambino G (2017) Cultivar-specific gene modulation in *Vitis vinifera*: analysis of the promoters regulating the expression of WOX transcription factors. *Sci Rep* 7: 45670.
- Bohanec B (2002) Doubled-haploid onions. In: Rabinowitch, HD, Currah L, (eds.) *Allium* crop science: recent advances. CAB International, Wallingford, UK, pp. 145-157.
- Bohanec B (2009) Doubled haploids via gynogenesis. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM (eds.) *Advances in haploid production in higher plants*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 35-46.
- Bolibok H, Gruszczyńska A, Hromada-Judycka A, Rakoczy-Trojanowska M (2007) The identification of QTLs associated with the *in vitro* response of rye (*Secale cereale* L.). *Cell Mol Biol Lett* 12: 523-535.
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH, Toole VK A (1952) reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc Natl Acad Sci USA* 38: 662-666.
- Boulard C, Thevenin J, Tranquet O, Laporte V, Lepiniec L, Dubreucq B (2018) LEC1 (NF-YB9) directly interacts with LEC2 to control gene expression in seed. *Biochim Biophys Acta* 1861: 443-450.
- Boutilier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu CM, van Lammeren AA, Miki BL, Custers JB, van Lookeren Campagne MM (2002) Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14: 1737-1749.
- Bozhkov PV, Mikhlina SB, Shityaeva GA, Lebedenko LA (1993) Influence of nitrogen balance of culture medium on Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) somatic polyembryogenesis: High frequency establishment of embryonal-suspensor mass lines from mature zygotic embryos. *J. Plant Physiol* 142: 735-741.
- Brand A, Quimbaya M, Tohme J, Chavarriaga-Aguirre P (2019) *Arabidopsis* *LEC1* and *LEC2* orthologous genes are key regulators of somatic embryogenesis in cassava. *Front Plant Sci* 10: 673.
- Bratzel F, López-Torrejón G, Koch M, Del Pozo JC, Calonje M (2010) Keeping cell identity in *Arabidopsis* requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. *Curr Biol* 20: 1853-1859.
- Braybrook SA, Stone SL, Park S, Bui AQ, Brandon HL, Fischer R, Goldberg RB, Harada JJ (2006) Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Pro Natl Acad Sci USA* 103: 3468-3473.
- Braybrook SA, Harada JJ (2008) LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci* 13: 624-630.
- Breuninger H, Rikirsch E, Hermann M, Ueda M, Laux T (2008) Differential expression of *WOX* genes mediates apical-basal axis formation in the *Arabidopsis* embryo. *Dev Cell* 14: 867-876.
- Brian PW, Hemming HG (1955) The effect of gibberellic acid on shoot growth and pea seedlings. *Physiol Plant* 8: 669-681.
- Butcher DN (1963) The presence of gibberellins in excised tomato roots. *J Exp Bot* 14: 272-280.

- Butcher DN, Clark JA, Lenton JR (1990) Gibberellins and the growth of excised tomato roots-comparison of *gib-1* mutant and wild-type and responses to applied GA₃ and 2S,3S paclobutrazol. *J Exp Bot* 41: 715-722.
- Budiarto K (2010) Spectral quality affects morphogenesis on *Anthurium* plantlet during *in vitro* culture. *Agrivita* 32: 234-240.
- Bustillo-Avenidaño E, Ibáñez S, Sanz O, Barross JAS, Gude I, Perianez-Rodriguez J, Micol JL, del Pozo JC, Moreno-Risueno MA, Pérez-Pérez JM (2018) Regulation of hormonal control, cell reprogramming and patterning during *de novo* root organogenesis. *Plant Physiol* 176: 1709-1727.
- Cabrera-Ponce JL, López L, León-Ramírez CG, Jofre-Garfias AE, Verver-y-Vargas A (2015) Stress induced acquisition of somatic embryogenesis in common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Protoplasma* 252: 559-570.
- Caillot S, Rosiau E, Laplace C, Thomasset B (2009) Influence of light intensity and selection scheme on regeneration time of transgenic flax plants. *Plant Cell Rep* 28: 359-371.
- Calderón-Villalobos LI, Lee S, De Oliveira C, Ivetac A, BrandtW, Armitage L, Sheard LB, Tan X, Parry G, Mao H, Zheng N, Napier R, Kepinski S, Estelle M (2012) A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat Chem Biol* 8: 477-485.
- Cakmak I (2000) Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol* 146: 185-205.
- Candela M, Velázquez I, De la Cruz B, Sendino AM, De la Peña A (2001) Differences in *in vitro* plant regeneration ability among four *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 638-643.
- Cao A, Zheng Y, Yu Y, Wang X, Shao D, Sun J, Cui B (2017) Comparative transcriptome analysis of SE initial dedifferentiation in cotton of different SE capability. *Sci Rep* 7: 1-13.
- Carrera E, Bou J, García-Martínez JL, Prat S (2000) Changes in *GA20-oxidase* gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *Plant J* 22: 247-256.
- Carimi F, De Pasquale F, Puglia AM (1998) *In vitro* rescue of zygotic embryos of sour orange, *Citrus aurantium* L, and their detection based on RFLP analysis. *Plant Breed* 117: 261-266.
- Carimi F, De Pasquale F, Crescimanno FG (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of *Citrus*. *Plant Cell Rep* 18: 935-940.
- Carlsson J, Svennerstam H, Moritz T, Egertsdotter U, Ganeteg U (2017) Nitrogen uptake and assimilation in proliferating embryogenic cultures of Norway spruce—investigating the specific role of glutamine. *PLoS ONE* 12: e0181785.
- Carlsson J, Egertsdotter U, Ganeteg U, Svennerstam H (2019) Nitrogen utilization during germination of somatic embryos of Norway spruce: revealing the importance of supplied glutamine for nitrogen metabolism. *Trees* 33: 383-394.
- Carman JG, Jefferson NE, Campbell WF (1987) Induction of embryogenic (*Triticum aestivum* L.) calli. I. quantification of cultivar and culture medium effects. *Plant Cell Tiss Org Cult* 10: 101-113.

- Casal JJ (2013) Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annu Rev Plant Biol* 64: 403-427.
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284: 760-765.
- Castillo AM, Valero-Rubira I, Burrell MA, Allué S, Costar MA, Vallés MP (2020) Trichostatin A affects developmental reprogramming of bread wheat microspores towards an embryogenic route. *Plants* 9:1442.
- Ceballos H, Iglesias CA, Pérez JC, Dixon AGO (2004) Cassava breeding: opportunities and challenges. *Plant Mol Biol* 56: 503-516.
- Chandler PM, Marion-Poll A, Ellis M, Gubler F (2002) Mutants at the *Slender1* locus of barley cv. Himalaya. Molecular and physiological characterization. *Plant Physiol* 19: 181-190.
- Chapman EJ, Greenham K, Castillejo C, Sartor R, Bialy A, Sun T, Estelle M (2012) Hypocotyl transcriptome reveals auxin regulation of growth-promoting genes through GA-dependent and independent pathways. *PLoS ONE* 7: e36210.4.
- Charriere F, Sotta B, Migniac E, Hahne G (1999) Induction of adventitious shoots or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: Variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiol Biochem* 37: 751-757.
- Chávez-Cortazar A, Rosas MM, Oyama, K. Samain MS, Quesada M (2020) Induction of somatic embryogenesis and evaluation of genetic stability in regenerated plants of *Magnolia dealbata*. *Biol Plantarum* 64: 224-233.
- Chee PP (1995) Somatic embryogenesis in cucurbits. In: Bajaj YPS (ed.) *Somatic embryogenesis and synthetic seed II. Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 31, Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 138-150.
- Che P, Lall S, Nettleton D, Howell SH (2006) Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiol* 141: 620-637.
- Chen YJ, Lai ZX (2001) Researches and utilization of somatic embryogenesis in fruits and trees. *J Fujian Agricult Univ* 30: 420-426.
- Chen JT, Chang WC (2003) Effect of GA₃, ancymidol, cycocel and paclobutrazol on direct somatic embryogenesis of *Oncidium in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 72: 105-108.
- Chen S, Kurdyukov S, Kereszt A, Wang X, Gresshoff P, and Rose R (2009) The association of hoemeobox gene expression with stem cell formation and morphogenesis in cultured *Medicago truncatula*. *Planta* 230: 827-840.
- Chen CC, Agrawal DC, Lee MR, Lee RJ, Kuo CL, Wu CR, Tsay HS, Chang HC (2016a) Influence of LED light spectra on *in vitro* somatic embryogenesis and LC-MS analysis of chlorogenic acid and rutin in *Peucedanum japonicum* Thunb.: a medicinal herb. *Bot Stud* 57: 1-9.
- Chen X, Yao Q, Gao X, Jiang C, Harberd NP, Fu X (2016b) Shoot-to-root mobile transcription factor HY5 coordinates plant carbon and nitrogen acquisition. *Curr Biol* 26: 640-646.
- Chen YM, Huang JZ, Hou TW, Pan IC (2019) Effects of light intensity and plant growth regulators on callus proliferation and shoot regeneration in the ornamental succulent *Haworthia*. *Bot Stud* 60: 10.

- Chen Y, Xu X, Liu Z, Zhang Z, Xu Han X, Lin Y, Lai Z (2020) Global scale transcriptome analysis reveals differentially expressed genes involve in early somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. BMC Genomics 21: 4.
- Cheng WH, Zhu HG, Tian WG, Zhu SH, Xiong XP, Sun YQ, Zhu QH, Sun J (2016) *De novo* transcriptome analysis reveals insights into dynamic homeostasis regulation of somatic embryogenesis in upland cotton (*G. hirsutum* L.). Plant Mol Biol 92: 279-292.
- Cheong EJ, Pooler MR (2004) Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February Pink. Plant Cell Rep 11: 810-815.
- Chiang HH, Hwang I, Goodman HM (1995) Isolation of the *Arabidopsis* GA4 locus. Plant Cell 7: 195-201.
- Chiappetta A, Fambrini M, Petrarulo M, Rapparini F, Michelotti V, Bruno L, Greco M, Baraldi R, Salvini M, Pugliesi C, Bitonti MB (2009) Ectopic expression of *LEAFY COTYLEDON1-LIKE* gene and localized auxin accumulation mark embryogenic competence in epiphyllous plants of *Helianthus annuus* × *H. tuberosus*. Ann Bot 103: 735-747.
- Chin DP, Bao JH, Mii M (2009) Transgenic spinach plants produced by *Agrobacterium*-mediated method based on the low temperature-dependent high plant regeneration ability of leaf explants. Plant Biotechnol 26: 243-248.
- Chiu RS, Saleh Y, Gazzarrini S (2016) Inhibition of FUSCA3 degradation at high temperature is dependent on ABA signaling and is regulated by the ABA/GA ratio. Plant Signal Behav 11: e1247137.
- Christianson ML, Warnick DA (1983) Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. Dev Biol 95: 288-293.
- Cho JN, Ryu JY, Jeong YM, Park J, Song JJ, Amasino RM, Noh B, Noh YS (2012) Control of seed germination by light-induced histone arginine demethylation activity. Dev Cell 22: 736-48.
- Choi YE, Yang DC, Choi KT (1998) Induction of somatic embryos by macrosalt stress from mature zygotic embryos of *Panax ginseng*. Plant Cell Tiss Org Cult 52: 177-181.
- Chory J, Chattrjee M, Cok RK, Elich T, Fankhauser C, Li J, Ngpal P, Neff M, Pepper A, Poole D, Reed, Vitart V (1996) From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. Proc Natl Acad Sci USA 93: 12066-12071.
- Christie JM (2007) Phototropin blue-light receptors. Annu Rev Plant Biol 58: 21-45.
- Chung HH, Chen JT, Chang WC (2005) Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium Chiengmai Pink* and subsequent plant regeneration. In Vitro Cell Dev Biol Plant 41: 765-769.
- Claeys H, Inzé D (2013) The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. Plant Physiol 162: 1768-1779.
- Clark SE, Jacobsen SE, Levin JZ, Meyerowitz EM (1996) The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. Development 122: 1567-1575.
- Cluis CP, Mouchel CF, Hardtke CS (2004) The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. Plant J 38: 332-347.

- Cohen J (1973) Eta-squared and partial eta-squared in fixed factor ANOVA designs. *Educ Psychol Meas* 33: 107-112.
- Coles JP, Phillips AL, Croker SJ, García-Lepe R, Lewis M, Hedden P (1999) Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of *gibberellin 20-oxidase* genes. *Plant J* 17: 547-556.
- Cortleven A, Schmülling T (2015) Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. *J Exp Bot* 66: 4999-5013.
- Cortleven A, Marg I, Yamburenko MV, Schlicke H, Hill K, Grimm B, Schaller GE, Schmülling T (2016) Cytokinin regulates the etioplast-chloroplast transition through the two-component signaling system and activation of chloroplast-related genes. *Plant Physiol* 172: 464-478.
- Cueva Agila AY, Guachizaca I, Cella R (2015) Combination of 2,4-D and stress improves indirect somatic embryogenesis in *Cattleya maxima* Lindl. *Plant Biosyst* 149: 235-241.
- Ćulafić Lj, Nešković M (1973) Induction of flowering of isolated *Spinacia oleracea* L. buds in sterile culture. *Bull Inst Jard Bot Univ Beograd* 8: 53-56.
- Ćulafić Lj, Nešković M (1980) Effect of growth substances on flowering and sex expression in isolated apical buds of *Spinacia oleracea*. *Physiol Plant* 48: 588-591.
- Dahleen LS (1995) Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels. *Plant Cell Tiss Org Cult* 43: 267-269.
- Dai M, Zhao Y, Ma Q, Hu Y, Hedden P, Zhang Q, Zhou DX (2007) The rice *YABBY1* gene is involved in the feedback regulation of gibberellin metabolism. *Plant Physiol* 144: 121-133.
- Davies PJ (1972) The fate of exogenously applied indole acetic acid in light grown stems. *Physiol Plant* 27: 262-270.
- de Almeida M, de Almeida CV, Mendes Graner E Brondani GE, de Abreu-Tarazi MF (2012) Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. *Plant Cell Rep* 31: 1495-1515.
- Debeaujon I, Branchard M (1993) Somatic embryogenesis in *Cucurbitaceae*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 34: 91-100.
- de la Paz Sanchez M, Aceves-García P, Petrone E, Steckenborn S, Vega-León R, Álvarez-Buylla ER, Garay-Arroyo A, García-Ponce B (2015) The impact of Polycomb group (PcG) and Trithorax group (TrxG) epigenetic factors in plant plasticity. *New Phytol* 208: 684-694.
- De-la-Peña C, Nic-Can GI, Galaz-Ávalos RM, Avilez-Montalvo R, Loyola-Vargas VM (2015) The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. *Front Plant Sci* 6: 635.
- Delporte F, Pretova A, Jardin P, Watillon B (2014) Morpho-histology and genotype dependence of *in vitro* morphogenesis in mature embryo cultures of wheat. *Protoplasma* 251: 1455-1470.
- De Lucas M, Davière JM, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blázquez MA, Titarenko E, Prat S (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451: 480-486.

- Denis E, Kbirri N, Mary V, Claisse G, Conde ESN, Kreis M, Deveaux Y (2017) WOX14 promotes bioactive gibberellin synthesis and vascular cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J* 90: 560-572.
- Desjardins Y, Dubuc JF, Badr A (2009) *In vitro* culture of plants: a stressful activity! *Acta Hort* 812: 29-50.
- Desgagné-Penix I, Sponsel VM (2008) Expression of gibberellin 20-oxidase1 (*AtGA20ox1*) in *Arabidopsis* seedlings with altered auxin status is regulated at multiple levels. *J Exp Bot* 59: 2057-2070.
- de Ménorval MA, Mir LM, Fernández ML, Reigada R (2012) Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: a comparative study of experiments in Silico and with cells. *PLoS ONE* 7: e41733
- de Vries SC, Booij H, Meyerink P, Huisman G, Wilde HD, Thomas TL, van Kammen A (1988) Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta* 176: 196-204.
- de Wit M, Ljung K, Fankhauser C (2015) Contrasting growth responses in lamina and petiole during neighbor detection depend on differential auxin responsiveness rather than different auxin levels. *New Phytol* 208: 198-209.
- Dill A, Sun T (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 159: 777-785.
- Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Sun T (2004) The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets GA signaling repressors for GA-induced degradation. *Plant Cell* 16: 1392-1405.
- Ding Z, Galván-Ampudia CS, Demarsy E, Łangowski Ł, Kleine-Vehn J, Fan Y, Morita MT, Tasaka M, Fankhauser C, Offringa R, Friml J (2011) Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol* 13: 44752.
- Ding M, Dong H, Xue Y, Su S, Wu Y, Li S, Liu H, Li H, Han J, Shan X, Yuan Y (2020) Transcriptomic analysis reveals somatic embryogenesis-associated signaling pathways and gene expression regulation in maize (*Zea mays* L.). *Plant Mol Biol* 104: 647-663.
- Dobrenel T, Marchive C, Azzopardi M, Clément G, Moreau M, Sormani R (2013) Sugar metabolism and the plant target of rapamycin kinase: a sweet operaTOR? *Front Plant Sci* 4: 93.
- Dodds JH, Roberts LW (1995) *Experiments in plant tissue culture*. 3rd edn, Cambridge University Press, London.
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J Exp Bot* 48: 1493-1509.
- Domžalska L, Kędracka-Krok S, Jankowska U, Grzyb M, Sobczak M, Rybczyński JJ, Mikuła A (2017) Proteomic analysis of stipe explants reveals differentially expressed proteins involved in early direct somatic embryogenesis of the treefern *Cyathea delgadii* Sternb. *Plant Sci* 258: 61-76.
- Dou H, Niu G, Gu M, Masabni JG (2017) Effects of light quality on growth and phytonutrient accumulation of herbs under controlled environments. *Hortic* 3: 36.
- Douglas TJ, Paleg LG (1974) Plant growth retardants as inhibitors of sterol biosynthesis in tobacco seedlings. *Plant Physiol* 54: 238-245.

- Duan L, Dietrich D, Ng CH, Yeen Chan PM, Bhalerao R, Bennett MJ, Dinneny JR (2013) Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 25: 324-341.
- Duan AQ, Feng K, Liu JX, Que F, Xu ZS, Xiong AS (2019) Elevated gibberellin altered morphology, anatomical structure, and transcriptional regulatory networks of hormones in celery leaves. *Protoplasma* 256: 1507-1517.
- Duarte-Aké F, Nic-Can G, De-la-Peña C (2019) Somatic embryogenesis: Polycomb complexes control cell-to-embryo transition. In: Alvarez-Venegas R, De-la-Peña C, Casas-Mollano J (eds.) *Epigenetics in plants of agronomic importance: fundamentals and applications*. Springer Nature, Switzerland, pp. 339-354.
- Duek PD, Elmer MV, Van Oosten VR, Fankhauser C (2004) The degradation of HFR1, a putative bHLH class transcription factor involved in light signaling, is regulated by phosphorylation and requires COP1. *Curr Biol* 14: 2296-2301.
- Dudits D, Bögre L, Györgyey J (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J Cell Sci* 99: 473-482.
- Dugardeyn J, Vandebussche F, Van der Straeten D (2008) To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross talk by *in silico* gene expression analysis? *J Exp Bot* 59: 1-16.
- Durley RC, Pharis RP (1973) Interconversion of gibberellin A4 to gibberellins A1 and A5 by dwarf rice, cultivar Tan-ginboztu. *Planta* 109: 357-361.
- Dutta Gupta S, Jatothu B (2013) Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnol Rep* 7: 211-220.
- Dutta Gupta S, Sahoo TK (2015) Light emitting diode (LED)-induced alteration of oxidative events during *in vitro* shoot organogenesis of *Curculigo orchioides* Gaertn. *Acta Physiol Plant* 37: 233.
- Dutta Gupta S, Agarwal A (2017) Influence of LED lighting on *in vitro* plant regeneration and associated cellular redox balance. In: Dutta Gupta S (ed.) *Light emitting diodes for agriculture*. Springer Nature, Singapore, pp. 273-303.
- Echávarri B, Cistue L (2016) Enhancement in androgenesis efficiency in barley (*Hordeum vulgare* L.) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by the addition of dimethyl sulfoxide to the mannitol pretreatment medium. *Plant Cell Tiss Org Cult* 125: 11-22.
- Economou AS, Read PE (1987) Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. *Hortic Sci* 22: 751-754.
- Edesi J, Kotkas K, Pirttilä AM, Häggman H (2014) Does light spectral quality affect survival and regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips after cryopreservation? *Plant Cell Tiss Org Cult* 119: 599-607.
- Eriksson S, Bohlenius H, Moritz T, Nilsson O (2006) GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *Plant Cell* 18: 2172-2181.
- Escalona MJC, Lorenzo B, Gonzalez M, Daquinta JL, Gonzalez YD, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep* 18: 743-748.

- Evans DA, Sharp WR, Paddock EF (1976) Variation in callus proliferation and root morphogenesis in leaf tissue cultures of *Glycine max* strain T 219. *Phytomorphol* 26: 379-384.
- Eveland AL, Jackson DP (2012) Sugars, signalling, and plant development. *J Exp Bot* 63: 3367-3377.
- Ezura H, Harberd NP (1995) Endogenous gibberellin levels influence *in vitro* shoot regeneration in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Planta* 197: 301-305.
- Fahad S, Nie L, Chen Y, Wu C, Xiong D, Saud S, Hongyan L, Cui K, Huang J (2015) Crop plant hormones and environmental stress. In: Lichtfouse E (ed.) *Sustainable agriculture reviews* Vol. 15, Springer, Switzerland, pp. 371-400.
- Farhadi N, Panahandeh J, Azar AM, Salte SA (2017) Effects of explant type, growth regulators and light intensity on callus induction and plant regeneration in four ecotypes of Persian shallot (*Allium hirtifolium*). *Sci Hortic* 218: 80-86.
- Fehér A, Pasternak T, Dudits (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74: 201-228.
- Fehér A (2008) The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biol Szeged* 52: 53-56.
- Fehér A (2015) Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim Biophys Acta-Gene Regul Mech* 1849: 385-402.
- Fehér A, Bernula D, Gémes K (2016) The many ways of somatic embryo initiation. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds.) *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*. Cham: Springer International Publishing, Switzerland, pp. 23-37.
- Fehér A (2019) Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? *Front Plant Sci* 10: 536.
- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz JM, Kircher S, Schäfer E, Fu X, Fan LM, Deng XW (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451: 475-480.
- Fernandez DE, Heck GR, Perry SE, Patterson SE, Bleecker AB, Fang SC (2000) The embryo MADS domain factor AGL15 acts postembryonically: inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression. *Plant Cell* 12: 183-197.
- Ferreira LT, de Araújo Silva MM, Ulisses C, Camara TR, Willadino L (2017) Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. *Plant Cell Tiss Org Cult* 128: 211-221.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol* 59: 387-415.
- Fischer C, Neuhaus G (1996) Influence of auxin on the establishment of bilateral symmetry in monocots. *Plant J* 9: 659-669.
- Fitch MMM (1993) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell Tiss Org Cult* 32: 205-212.
- Fleet CM, Yamaguchi S, Hanada A, Kawaide H, David CJ, Kamiya Y, Sun T (2003) Overexpression of *AtCPS* and *AtKS* in *Arabidopsis* confers increased ent-kaurene production but no increase in bioactive gibberellins. *Plant Physiol* 132: 830-839.

- Fleet CM, Sun TP (2005) A DELLA cate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* 8: 77-85.
- Fletcher RA, McCullag D (1971) Cytokinin-induced chlorophyll formation in cucumber cotyledons. *Planta* 101: 88.
- Fletcher RA, Gilley A, Davis TD, Sankhla N (2000) Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Horticultural Rev* 24: 55-138.
- Florez SL, Erwin RL, Maximova SN, Gultinan MJ, Curtis WR (2015) Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABY BOOM transcription factor. *BMC Plant Biol* 15: 121.
- Franklin KA, Whitelam GC (2004) Light signals, phytochromes and cross-talk with other environmental cues. *J Exp Bot* 55: 271-276.
- Frigerio M, Alabadí D, Pérez-Gómez J, García-Cárcel L, Phillips AL, Hedden P, Blázquez MA (2006) Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 142: 553-563.
- Friml J, Yang X, Michniewicz M, Weijers D, Quint A, Tietz O, Benjamins R, Ouwerkerk PBF, Ljung K, Sandberg G, Hooykaas PJJ, Palme K, Offringa R (2004) A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* 306: 862-865.
- Friml J (2010) Subcellular trafficking of PIN auxin efflux carriers in auxin transport. *Eur J Cell Biol* 89: 231-235.
- Folta KM, Pontin MA, Karlin-Neumann G, Bottini R, Spalding EP (2003) Genomic and physiological studies of early cryptochrome 1 action demonstrate roles for auxin and gibberellin in the control of hypocotyl growth by blue light. *Plant J* 36: 203-214.
- Folta KM, Childers KS (2008) Light as a growth regulator: controlling plant biology with narrow-bandwidth solid-state lighting systems. *HortSci* 43:1957-1964.
- Fonouni-Farde C, Kisiala A, Brault M, Emery RJN, Diet A, Frugier F (2017) DELLA1-mediated gibberellin signaling regulates cytokinin-dependent symbiotic nodulation. *Plant Physiol* 175: 1795-1806.
- Foo EJ, Platten D, Weller JL, Reid JB (2006) PhyA and cry1 act redundantly to regulate gibberellin levels during de-etiolation in blue light. *Physiol Plant* 127: 149-156.
- Forghani AH, Almodares A, Ehsanpour AA (2018) Potential objectives for gibberellic acid and paclobutrazol under salt stress in sweet sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] Moench cv. Sofra). *Appl Biol Chem* 61: 113-124.
- Fu X, Harberd NP (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421: 740-743.
- Fujimura T, Komamine A (1975) Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Sci Lett* 5: 359-364.
- Fukazawa J, Teramura H, Murakoshi S, Nasuno K, Nishida N, Ito T, Yoshida M, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y (2014) DELLAs function as coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of gibberellin homeostasis and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 2920-2938.

- Fukazawa J, Mori M, Watanabe S, Miyamoto C, Ito T, Takahashi Y (2017) DELLA-GAF1 complex is a main component in gibberellin feedback regulation of GA20 oxidase 2. *Plant Physiol* 175: 1395-1406.
- Gabriele S, Rizza A, Martone J, Circelli P, Costantino P, Vittorioso P (2010) The Dof protein DAG1 mediates PIL5 activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene *AtGA3ox1*. *Plant J* 61: 312-323.
- Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul* 43: 27-47.
- Gaj MD, Zhang SB, Harada JJ, Lemaux PG (2005) Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta* 222: 977-988.
- Gaj MD, Trojanowska A, Ujczak A, Mędrak M, Koziół A, Garbaciak B (2006) Hormone-response mutants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. impaired in somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul* 49: 183-197.
- Galen C, Rabenold JJ, Liscum E (2007) Light-sensing in roots. *Plant Signal Behav* 2: 106-108.
- Gallego-Bartolomé J, Minguet EG, Grau-Enguix F, Abbas M, Locascio A, Thomas SG, Alabadí D, Blázquez MA (2012) Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 13446-13451.
- Gallego-Giraldo L, Ubeda-Tomás S, Gisbert C, García-Martínez JL, Moritz T, López-Díaz I (2008) Gibberellin homeostasis in tobacco is regulated by gibberellin metabolism genes with different gibberellin sensitivity. *Plant Cell Physiol* 49: 679-690.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158.
- Ganesan M, Jayabalan N (2004) Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). *Plant Cell Rep* 23: 181-187.
- Garces HMP, Champagne CEM, Townsley BT, Park S, Malho R, Pedroso MC, Harada JJ, Sinha NR (2007) Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15578-15583.
- García-Martínez JL, Gil J (2001) Light regulation of gibberellin biosynthesis and mode of action. *J Plant Growth Regul* 20: 354-368.
- Gao XH, Xiao SL, Yao QF, Wang YJ, Fu XD (2011) An updated GA signaling 'relief of repression' regulatory model. *Mol Plant* 4: 601-606.
- Gao X, Zhang Y, He Z, Fu X (2017) Gibberellins. In: Li JY, Li CY, Smith SM (eds.) *Hormone metabolism and signaling in plants*. Academic Press, New York, USA, pp: 107-160.
- Gašić K, Hernandez A, Korban S (2004) RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol Biol Rep* 22:437a-437g.
- Gazara RK, De Oliveira EG, Rodrigues BC, Nunes Da Fonseca R, Oliveira AEA, Venancio TM (2019) Transcriptional landscape of soybean (*Glycine max*) embryonic axes during germination in the presence of paclobutrazol, a gibberellin biosynthesis inhibitor. *Sci Rep* 9: 9601.

- Ge Y, Yan F, Zourelidou M, Wang M, Ljung K, Fastner A, Hammes UZ, Di Donato M, Geisler M, Schwechheimer C, Tao Y (2017) SHADE AVOIDANCE 4 is required for proper auxin distribution in the hypocotyl. *Plant Physiol* 173: 788-800.
- Geekiyange S, Takase T, Watanabe S, Fukai S, Kiyouse T (2006) The combined effect of photoperiod, light intensity and GA₃ on adventitious shoot regeneration from cotyledons of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Biotechnol* 23: 431-435.
- George EF, Hall MA, De Klerk GJ (2008) *Plant propagation by tissue culture*. 3rd edn, Springer, The Netherlands, pp. 1-477.
- Gerdakaneh M, Mozafari AA, Sioseh-Mardah A, Sarabi B (2011) Effects of different amino acids on somatic embryogenesis of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Acta Physiol Plant* 33: 1847-1852.
- Germanà MA (2003) Somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Citrus aurantium* and *C. reticulata*. *Biologia* 58: 843.
- Germanà MA, Benedetta C, Calogero I, Rosario M (2005) The effect of light quality on anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *Acta Physiol Plant* 4: 717-721.
- Ghosh A, Igamberdiev AU, Debnath SC (2018) Thidiazuron-induced somatic embryogenesis and changes of antioxidant properties in tissue cultures of half-high blueberry plants. *Sci Rep* 8: 16978.
- Gliwicka M, Nowak K, Balazadeh S, Mueller-Roeber B, Gaj MD (2013) Extensive modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 8: e69261.
- Godel-Jedrychowska K, Kulinska-Lukaszek K, Horstman A, Soriano M, Li MF, Malota K, Boutlier K, Kurczynska EU (2020) Symplasmic isolation marks cell fate changes during somatic embryogenesis. *J Exp Bot* 71: 2612-2628.
- Gopi R, Jaleel C, Sairam R, Lakshmanan GMA, Gomathinayagam M, Panneerselvam R (2007) Differential effects of hexaconazole and paclobutrazol on biomass, electrolyte leakage, lipid peroxidation and antioxidant potential of *Daucus carota* L. *Colloid Surface B* 60: 180-186.
- Gow WP, Chen JT, Chang WC (2009) Effects of genotype, light regime, explant position and orientation on direct somatic embryogenesis from leaf explants. *Acta Physiol Plant* 2: 363-369.
- Goyer A (2010) Thiamine in plants: Aspects of its metabolism and functions. *Phytochem* 71: 1615-1624.
- Graebe JE (1987) Gibberellin biosynthesis and control. *Ann Rev Plant Physiol* 38: 419-465.
- Grennan AK (2006) Gibberellin metabolism enzymes in rice. *Plant Physiol* 141: 524-526.
- Grieneisen VA, Xu J, Maree AF, Hogeweg P, Scheres B (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 449: 1008-1013.
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun T, Thomas SG (2006) Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 3399-3414.

- Grimes HD, Hodges TK (1990) The inorganic NO_3^- : NH_4^+ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Physiol* 136: 362-367.
- Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P, Meyerowitz EM (2007) Pattern formation during *de novo* assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development* 134: 3539-3548.
- Grossmann K (1990) Plant growth retardants as tools in physiological research. *Physiol Plant* 78: 640-648.
- Grubb CD, Abel S (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Sci* 11: 89-100.
- Grzybkowska D, Morończyk J, Wójcikowska B, Gaj MD (2018) Azacitidine(5-AzaC)-treatment and mutations in DNA methylase genes affect embryogenic response and expression of the genes that are involved in somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul* 85: 243-256.
- Grzybkowska D, Nowak K, Gaj MD (2020) Hypermethylation of auxin-responsive motifs in the promoters of the transcription factor genes accompanies the somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Int J Mol Sc* 21: 6849.
- Gulzar B, Mujib A, Mushtaq Z, Malik MQ (2021) Old *Catharanthus roseus* culture (14 years) produced somatic embryos and plants and showed normal genome size; demonstrated an increased antioxidant defense mechanism; and synthesized stress proteins as biochemical, proteomics, and flow-cytometry studies reveal. *J Appl Genetics* 62: 43-57.
- Guo F, Liu C, Xia H, Bi Y, Zhao C, Zhao S, Hou L, Li F, Wang X (2013) Induced expression of *AtLEC1* and *AtLEC2* differentially promotes somatic embryogenesis in transgenic tobacco plants. *PLoS ONE* 8: e71714.
- Gupta SK, Singh PK, Sawant SV, Chaturvedi R, Tuli R (2000) Effect of light intensity on *in vitro* multiple shoot induction and regeneration of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv Khandawa-2). *Indian J Exp Biol* 38: 399-401.
- Guzzo F, Baldan B, Mariani P, Lo Schiavo F, Terzi M (1994) Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. *J Exp Bot* 45: 1427-1432.
- Guan YR, Xue JQ, Xue YQ, Yang RW, Wang SL, Zhang XX (2019) Effect of exogenous GA_3 on flowering quality, endogenous hormones, and hormone- and flowering-associated gene expression in forcing-cultured tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *J Integr Agric* 18: 1295-1311.
- Haberlandt G (1902) Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. *Sitzungsber Math –Naturwiss Kl Kais Akad Wiss* 111: 454-461.
- Hadfi K, Speth V, Neuhaus G (1998) Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development* 125: 879-887.
- Hahn EJ, Kozai T, Paek KY (2000) Blue and red light-emitting diodes with or without sucrose and ventilation affect *in vitro* growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets. *J Plant Biol* 43: 247-250.
- Haecker A, Groß-Hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M, Laux T (2004) Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 131: 657-668.
- Hallavant C, Ruas MP (2014) The first archaeobotanical evidence of *Spinacia oleracea* L. (spinach) in late 12th–mid 13th century AD France. *Veg Hist Archaeobot* 23: 153-165.

- Halliday KJ, Martínez-García JF, Josse EM (2009) Integration of light and auxin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a001586.
- Hamama L, Voisine L, Naouar A, Gala R, Cesbron D, Michel G, Leplat F, Foucher F, Hibrand Saint Oyant L, Dorion N (2012) Effect of GA₃ and paclobutrazol on adventitious shoot regeneration of two *Pelargonium* sp. *Acta Hort* 961: 187-194.
- Han F, Zhu B (2011) Evolutionary analysis of three gibberellin oxidase genes in rice, *Arabidopsis*, and soybean. *Gene* 473: 23-35.
- Han Q, Bartels A, Cheng X, Meyer A, An YQC, Hsieh TF, Xiao W (2019) Epigenetics regulates reproductive development in plants. *Plants* 8: 564.
- Harberd NP, Belfield E, Yasumura Y (2009) The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* 21: 1328-1339.
- Harding EW, Tang W, Nichols KW, Fernandez DE, Perry SE (2003) Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of *AGAMOUS* like 15. *Plant Physiol* 133: 653-663.
- Hassanpour-Estahbanati A, Demarly Y (1985) Plant regeneration from protoplasts of *Solanum pennellii*: effect of photoperiod applied to donor plants. *J Plant Physiol* 121: 171-174.
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt EDL, Boutilier K, Grossniklaus U, De Vries SC (2001) The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* 127: 803-816.
- Hedden P (1990) Gibberellin biosynthetic enzymes and the regulation of gibberellin concentration. In: Takahashi N, Phinney BO, MacMillan J (eds.) *Gibberellins*. Springer Heidelberg, Germany, pp. 94-105.
- Hedden P, Croker SJ (1992) Regulation of gibberellin biosynthesis in maize seedlings. In: Vreugdenhil D (ed.) *Progress in plant growth regulation: Proceedings of the 14th International conference on plant growth substances*. Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 534–544.
- Hedden P, Kamiya Y (1997) Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 431-460.
- Hedden P (1999) Recent advances in gibberellin biosynthesis. *J Exp Bot* 20: 553-563.
- Hedden P, Phillips A (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* 5: 523-530.
- Hedden P, Thomas SG (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J* 444: 11-25.
- Hedden P, Sponsel V (2015) A century of gibberellin research. *J Plant Growth Regul* 34: 740-760.
- Hedden P (2016) Gibberellin biosynthesis in higher plants. In: Hedden P, Thomas SG (eds.) *Ann Plant Rev*, Vol. 49: *Gibberellins*. John Wiley & Sons, Hoboken, USA, pp: 37-72.
- Hedden P (2020) The current status of research on gibberellin biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 61: 1832-1849.

- Helliwell CA, Sheldon CC, Olive MR, Walker AR, Zeevaart JAD, Peacock WJ, Dennis ES (1998) Cloning of the *Arabidopsis* ent-kaurene oxidase gene *GA3*. Proc Natl Acad Sci USA 95: 9019-9024.
- Helliwell CA, Poole A, Peacock WJ, Dennis ES (1999) *Arabidopsis* ent-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. Plant Physiol 119: 507-510.
- Helliwell C, Chandler P, Poole A, Dennis ES, Peacock WJ (2001) The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. Proc Natl Acad Sci USA 98: 2065-2070.
- Henderson JT, Li HC, Rider SD, Mordhorst AP, Romero-Severson J, Cheng JC, Robey J, Sung ZR, de Vries SC, Ogas J (2004) PICKLE acts throughout the plant to repress expression of embryonic traits and may play a role in gibberellin-dependent responses. Plant Physiol 134: 995-1005.
- Heo JW, Lee CW, Chakrabarty D, Paek KY (2002) Growth responses of marigold and salvia bedding plants as affected by monochromic or mixture radiation provided by a light-emitting diode (LED). J Plant Growth Regul 38: 225-230.
- Heringer AS, Vale EM, Barroso T, Santa-Catarina C, Silveria V (2013) Polyethylene glycol effects on somatic embryogenesis of papaya hybrid UENF/CALIMAN 01 seeds. Theor Exp Plant Physiol 25: 116-124.
- Heringer AS, Reis RS, Passamani LZ, de Souza-Filho GA, Santa-Catarina C, Silveira V (2017) Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. Acta Physiol Plant 39: 52.
- Heringer AS, Santa-Catarina C, Silveira V (2018) Insights from proteomic studies into plant somatic embryogenesis. Proteomics 18: 1700265.
- Hershey DM, Lu X, Zi J, Peters RJ (2014) Functional conservation of the capacity for ent-kaurene biosynthesis and an associated operon in certain rhizobia. J Bacteriol 196: 100-106.
- Higashi K, Kamada H, Harada H (1996) The effect of reduced nitrogenous compounds suggests that glutamine synthetase activity is involved in the development of somatic embryos in carrot. Plant Cell Tiss Org Cult 45: 109-114.
- Hisamatsu T, King RW, Helliwell CA, Koshioka M (2005) The involvement of gibberellin 20-oxidase genes in phytochrome regulated petiole elongation of *Arabidopsis*. Plant Physiol 138: 1106-1116.
- Hoad GV (1995) Transport of hormones in the phloem of higher plants. Plant Growth Regul 16: 173-182.
- Hoecker U, Toledo-Ortiz G, Bender J, Quail PH (2004) The photomorphogenesis-related mutant *red1* is defective in CYP83B1, a red light-induced gene encoding a cytochrome P450 required for normal auxin homeostasis. Planta 219: 195-200.
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJJ (2008) Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, afterripening, dormancy and germination. New Phytol 179: 33-54.
- Honi U, Amin MR, Kabir SMT, Bashar KK, Moniruzzaman M, Jahan R, Jahan S, Haque MS, Islam S (2020) Genome-wide identification, characterization and expression profiling of gibberellin metabolism genes in jute. BMC Plant Biol 20: 306.

- Horstman A, Bemer M, Boutilier K (2017a) A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration* 4: 201-216.
- Horstman A, Li M, Heidmann I, Weemen M, Chen B, Muino JM, Angenent GC, Boutilier K (2017b) The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 175: 848-857.
- Hou H, Wang P, Zhang H, Wen H, Gao F, Ma N, Wang Q, Li L (2015) Histone acetylation is involved in gibberellin-regulated *sodCp* gene expression in maize aleurone layers. *Plant Cell Physiol* 56: 2139-2149.
- Hu H, Xiong L, Yang Y (2005) Rice *SERK1* gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cells and host defense response against fungal infection. *Planta* 222: 107-117.
- Hu J, Mou B, Vick B (2007) Genetic diversity of 38 spinach (*Spinacia oleracea* L.) germplasm accessions and 10 commercial hybrids assessed by TRAP markers. *Genet Resour Crop Evol* 54: 1667-1674.
- Hu J, Mitchum MG, Barnaby N, Ayele BT, Ogawa M, Nam E, Lai WC, Hanada A, Alonso JM, Ecker JR, Swain SM, Yamaguchi S, Kamiya Y, Sun TP (2008) Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 320-336.
- Hu YL, Zhou LM, Huang MK, He XM, Yang YH, Liu X, Li YG, Hou XL (2018a) Gibberellins play an essential role in late embryogenesis of *Arabidopsis*. *Nat Plants* 4: 289-298.
- Hu J, Israeli A, Ori N, Suna TP (2018b) The interaction between DELLA and ARF/IAA mediates crosstalk between gibberellin and auxin signaling to control fruit initiation in tomato. *Plant Cell* 30: 1710-1728.
- Huang S, Raman AS, Ream JE, Fujiwara H, Cerny RE, Brown SM (1998) Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin – overproduction phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 118: 773-781.
- Huang WL, Tsung YC, Liu LF (2002) Osmotic stress promotes shoot regeneration in immature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.). *J Agric Assoc China* 3: 76-86.
- Huang H, Han SS, Wang Y, Zhang XZ, Han ZH (2012a) Variations in leaf morphology and DNA methylation following *in vitro* culture of *Malus xiaojinensis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 111: 153-161.
- Huang WL, Lee CH, Chen YR (2012b) Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress. *Plant Cell Tiss Org Cult* 108: 257-263.
- Huizen R, Ozga JA, Reinecke DM (1997) Seed and hormonal regulation of *gibberellin 20-oxidase* expression in pea pericarp. *Plant Physiol* 115: 123-128.
- Hussam SMK, Al-Hamdany MHS, Abdulkareem AA, Saleh FF (2015) Influence of sucrose and paclobutazone on callus growth and somatic embryogenesis in date palm cv. Bream. *Int J Curr Res Aca Rev* 1: 270-276.
- Hutchinson MJ, Krishnaraj S, Saxena PK (1997) Inhibitory effect of GA₃ on the development of thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) hypocotyl cultures. *Plant Cell Rep* 16: 435-438.

- Huq E (2018) Direct convergence of light and auxin signaling pathways in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 11: 515-517.
- Ichihashi S, Islam MO (1999) Effects of complex organic additives on callus growth in three orchid genera, *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* and *Neofinetia*. *J Japan Soc Hort Sci* 68: 269-274.
- Igielski R, Kępczyńska E (2017) Gene expression and metabolite profiling of gibberellin biosynthesis during induction of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* Gaertn. *PLoS ONE* 12: e0182055.
- Ikeda, A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M Yamaguchi J (2001) Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell* 13: 999-1010.
- Ikeda-Iwai M, Umehara M, Satoh S, Kamada H (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 34:107-114.
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A (2013) Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25:3159-3173.
- Ikeuchi M, Iwase A, Rymen B, Harashima H, Shibata M, Ohnuma M, Breuer C, Karina Morao A, de Lucas M, De Veylder L, Goodrich J, Brady SM, Roudier F, Sugimoto K (2015) PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in *Arabidopsis*. *Nat Plants* 1: 15089.
- Ikeuchi M, Ogawa Y, Iwase A, Sugimoto K (2016) Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development* 143: 1442-1451.
- Iraqi D, Tremblay FM (2001a) The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) BSP) and white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos. *Physiol Plant* 111: 381-388.
- Iraqi D, Tremblay FM (2001b) Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *J Exp Bot* 52: 2301-2311.
- Ishida S, Fukazawa J, Yasa T, Takahashi Y (2004) Involvement 14-3-3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator REPRESSION OF SHOOT GROWTH by gibberellin. *Plant Cell* 16: 2641-2651.
- Ishizaki T, Komai F, Masuda K, Megumu C (2000) Exogenous ethylene enhances formation of embryogenic callus and inhibits embryogenesis in cultures of explants of spinach roots. *J Am Soc Hort Sci* 125: 21-24.
- Ishizaki T, Komai F, Masuda K (2001) Screening for strongly regenerative genotypes of spinach in tissue culture using subcultured root explants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 67: 251-255.
- Ishizaki T, Megumi C, Komai F, Masuda K, Oosawa K (2002) Accumulation of a 31-kDa glycoprotein in association with the expression of embryogenic potential by spinach callus culture. *Physiol Plantarum* 114: 109-115.
- Islam MO, Rahman ARMM, Matsui S, Prodhan AKMA (2003) Effects of complex organic extracts on callus growth and PLB regeneration through embryogenesis in the *Doritaenopsis orchid*. *JARQ* 37: 229-235.

- Israelsson M, Mellerowcz E, Chon M, Gullberg J, Moritz T (2004) Cloning and overproduction of gibberellin 3-oxidase in hybrid aspen trees. Effect on gibberellin homeostasis and development. *Plant Physiol* 135: 221-230.
- Ito Y, Takaya K, Kurata N (2005) Expression of *SERK* family receptor-like protein kinase genes in rice. *Biochim Biophys Acta* 1730: 253-258.
- Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33: 245-254.
- Jackson SD, James PE, Carrera E, Prat S, Thomas B (2000) Regulation of transcript levels of a potato *gibberellin 20-oxidase* gene by light and phytochrome B. *Plant Physiol* 124: 423-430.
- Jaleel CA, Gopi R, Manivannan P, Panneerselvam R (2007a) Responses of antioxidant defense system of *Catharanthus roseus* (L.) to paclobutrazol treatment under salinity. *Acta Physiol Plantarum* 29: 205-209.
- Jaleel CA, Manivannan P, Sankar B, Kishorekumar A, Sankari S, Panneerselvam R (2007b) Paclobutrazol enhances photosynthesis and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. *Process Biochem* 42: 1566-1570.
- Jaleel CA, Gopi R, Panneerselvam R (2008a) Growth and photosynthetic pigments responses of two varieties of *Catharanthus roseus* to triadimefon treatment. *Comptes Rendus Biologies* 331: 272-277.
- Jaleel CA, Manivannan P, Lakshmanan GMA, Gomathinayagam M, Panneerselvam R (2008b) Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloid Surface B* 61: 298-303.
- Jani JN, Jha SK, Nagar DS (2015) Root explant produces multiple shoot from pericycle in *Psoralea corylifolia*—a leprosy destroyer medicinal plant. *Ind Crops Prod* 67: 324-329.
- Jao RC, Lai CC, Fang W, Chang SF (2005) Effects of red light on the growth of *Zantedeschia* plantlets *in vitro* and tuber formation using light-emitting diodes. *HortScience* 40: 436-438.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080.
- Jha P, Ochatt SJ, Kumar V (2020) *WUSCHEL*: a master regulator in plant growth signaling. *Plant Cell Rep* 39: 431-444.
- Ji A, Geng X, Zhang Y, Yang H, Wu H (2011) Advances in somatic embryogenesis research of horticultural plants. *American J Plant Sci* 2: 727-732.
- Ji L, Mathioni SM, Johnson S, Tucker D, Bewick AJ, Do Kim K, Daron J, Slotkin RK, Jackson SA, Parrott WA, Meyers BC, Schmitz RJ (2019) Genome-wide reinforcement of DNA methylation occurs during somatic embryogenesis in soybean. *Plant Cell* 31: 2315-2331.
- Jia HY, Yi DL, Yu J, Xue SL, Xiang Y, Zhang CQ, Zhang ZZ, Zhang LX, Ma ZQ (2007) Mapping QTLs for tissue culture response of mature wheat embryos. *Mol Cells* 23: 323-330.
- Jia H, Yu J, Yi D, Cheng Y, Xu W, Zhang L, Ma Z (2009) Chromosomal intervals responsible for tissue culture response of wheat immature embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 97: 159-165.
- Jia H, Suzuki M, McCarty DR (2014) Regulation of the seed to seedling developmental phase transition by the LAFL and VAL transcription factor networks. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 3: 135-145.

- Jiang SY, Ramamoorthy R, Bhalla R, Luan HF, Venkatesh PN, Cai M, Ramachandran S (2008) Genome-wide survey of the RIP domain family in *Oryza sativa* and their expression profiles under various abiotic and biotic stresses. *Plant Mol Biol* 67: 603-614.
- Jiang Z, Xu G, Jing Y, Tang W, Lin R (2016) Phytochrome B and REVEILLE1/2-mediated signalling controls seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 7: 12377.
- Jiang F, Ryabova D, Diedhiou J, Hucl P, Randhawa H, Marillia EF, Foroud NA, Eudes F, Kathiria P (2017) Trichostatin A increases embryo and green plant regeneration in wheat. *Plant Cell Rep* 36:1701-1706.
- Jiménez VM, Bangerth F (2001a) Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. *Plant Cell Tiss Org Cult* 67: 37-46.
- Jiménez VM, Bangerth F (2001b) Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. *Plant Sci* 160: 247-257.
- Jiménez VM (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul* 47: 91-110.
- Jiménez VM, Guevara E, Herrera J, Bangerth F (2005) Evolution of endogenous hormone concentration in embryogenic cultures of carrot during early expression of somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 23: 567-572.
- Jiménez V, Thomas C (2006) Participation of Plant Hormones in Determination and Progression of Somatic Embryogenesis In: Mujid A, Samaj J (eds.) *Somatic embryogenesis, plant cell monographs*, Vol. 2, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp. 103-118.
- Jin F, Hu L, Yuan D, Xu J, Gao W, He L, Yang X, Zhang X (2014a) Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnol J* 12: 161-173.
- Jin F, Hu L, Yuan D, Xu J, Gao W, He L, Yang X, Zhang X (2014b) Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnol J* 12: 161-173.
- Jin Q, Wang Y, Li X, Wu S, Wana Y, Luo J, Mattson Neil, Y Xu (2017) Interactions between ethylene, gibberellin and abscisic acid in regulating submergence induced petiole elongation in *Nelumbo nucifera*. *Aquat Bot* 137: 9-15.
- Jo L, Pelletier JM, Harada JJ (2019) Central role of the LEAFY COTYLEDON1 transcription factor in seed development. *J Integr Plant Biol* 6: 564-580.
- Jo L, Pelletier JM, Hsu SW, Baden R, Goldberg RB, Harada JJ (2020) Combinatorial interactions of the LEC1 transcription factor specify diverse developmental programs during soybean seed development. *Proc Natl Acad Sci USA* 117: 1223-1232.
- Jones RL, Phillips ID (1996) Organs of gibberellin synthesis in light-grown sunflower plants. *Plant Physiol* 41: 1381-1386.
- Jungklang J, Saengnil K (2012) Effect of paclobutrazol on patumma cv. Chiang Mai Pink under water stress. *Songklanakarin J Sci Technol* 34: 361-366.

- Jungklang J, Saengnil K, Uthaibutra J (2017) Effects of water-deficit stress and paclobutrazol on growth, relative water content, electrolyte leakage, proline content and some antioxidant changes in curcuma alismatifolia gagnep. cv. chiang mai pink. Saudi J Biol Sci 24: 1505-1512.
- Junker A, Mönke G, Rutten T, Keilwagen J, Seifert M, Thi TM, Renou JP, Balzergue S, Viehöver P, Hähnel U, Ludwig-Müller J, Altschmied L, Conrad U, Weisshaar B, Bäumlein H (2012) Elongation-related functions of LEAFY COTYLEDON1 during the development of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 71: 427-442.
- Kairong C, Ji L, Gengmei X, Jianlong L, Lihong W, Yafu W (2002) Effect of hydrogen peroxide on synthesis of proteins during somatic embryogenesis in *Lycium barbarum*. Plant Cell Tiss Org Cult 68: 187-193.
- Kamada H, Tachikawa Y, Saitou T, Harada H (1994) Heat stress induction of carrot somatic embryogenesis. Plant Tiss Cult Lett 11: 229-232.
- Kamiya Y, García-Martínez JL (1999) Regulation of gibberellin biosynthesis by light. Curr Opin Plant Biol 2: 398-403.
- Kamran M, Cui W, Ahmad I, Meng X, Zhang X, Su W, Chen J, Ahmad S, Fahad S, Han Q, Liu T (2018) Effect of paclobutrazol, a potential growth regulator on stalk mechanical strength, lignin accumulation and its relation with lodging resistance of maize. Plant Growth Regul 84: 317-332.
- Kamounsis AP, Sereli C (1999) Paclobutrazol affects growth and flower bud production in gardenia under different light regimes. HortScience 34: 674-675.
- Kanan S, Malkawi A (2018) Gibberellic acid content of spinach in relation to photoperiod, temperature, and flower induction. J Biol Active Product Nature 8: 393-406.
- Kaneko M, Itoh H, Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Matsuoka M (2003) Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants? Plant J 35: 104-115.
- Kanwar K, Joseph J, Deepika R (2010) Comparison of *in vitro* regeneration pathways in *Punica granatum* L. Plant Cell Tiss Org Cult 100: 199-207.
- Kapazoglou A, Drosou V, Argiriou A, Tsaftaris AS (2013) The study of a barley epigenetic regulator, HvDME, in seed development and under drought. BMC Plant Biol 13: 172.
- Karami O, Aghavaisi B, Pour AM (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. J Chem Biol 2: 177-190.
- Katagi T, Mikami N, Matsuda T, Miyamoto J (1987) Structural studies of the plant growth regulator uniconazole (ES pure) and computer-aided analysis of its interaction with cytochrome P-450. J Pesticide Sci 12: 627-633.
- Katyayini NU, Rinne PLH, Tarkowská D, Strnad M, van der Schoot C (2020) Dual role of gibberellin in perennial shoot branching: inhibition and activation. Front Plant Sci 11: 736.
- Kawade K, Ishizaki T, Masuda K (2008) Differential expression of ribosome-inactivating protein genes during somatic embryogenesis in spinach (*Spinacia oleracea*). Physiol Plantarum 134: 270-281.
- Kawade K, Masuda K (2009) Transcriptional control of two ribosome – inactivating protein genes expressed in spinach (*Spinacia oleracea*) embryos. Plant Physiol Biochem 47: 327-334.

- Kawahara R, Komamine A (1995) Molecular basis of somatic embryogenesis. In: Bajaj YPS (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 30: Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 30-40.
- Kępczyńska E, Orłowska A (2021) Profiles of endogenous ABA, bioactive GAs, IAA and their metabolites in *Medicago truncatula* Gaertn. non-embryogenic and embryogenic tissues during induction phase in relation to somatic embryo formation. *Planta* 13: 253-267.
- Kepenek K, Karoglu Z (2011) The effects of paclobutrazol and daminozid on *in vitro* micropropagation of some apple (*Malus domestica*) cultivars and M9-rootstock. *Afri J Biotechnol* 10: 4851-4859.
- Kepinski S, Leyser O (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446-451.
- Keuskamp DH, Pollmann S, Voesenek LA, Peeters AJ, Pierik R (2010) Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 22740-22744.
- Kharasch N, Thyagarajan BS (1983) Structural basis for biological activities of dimethyl sulfoxide. *Annal NY Acad Sci* 411: 391-402.
- Kim YW, Moon HK (2007) Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 88: 241-245.
- Kim DH, Yamaguchi S, Lim S, Oh E, Park J, Hanada A, Kamiya Y, Choi G (2008) SOMNUS, a CCCH-type zinc finger protein in *Arabidopsis*, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5. *Plant Cell* 20: 1260-1277.
- Kim DH, Lee B, Kim MJ, Park MH, An HJ, Lee EK, Chung KW, Park JW, Yu BP, Choi JS, Chung, HY (2016) Molecular mechanism of betaine on hepatic lipid 431metabolism: inhibition of forkhead box O1 (FoxO1) binding to peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ). *J Agric Food Chem* 64: 6819-6825.
- Kishorekumar KA, Jaleel C, Manivannan P, Sankar B, Sridharan R, Somasundaram R (2006) Differential effects of hexaconazole and paclobutrazol on the foliage characteristics of chinese potato (*Solenostemon rotundifolius* Poir., J.K. Morton). *Acta Biol Szeged* 50: 127-129.
- Knöfel HD, Schwarzkopf E, Müller P, Sembdner G (1984) Enzymic glucosylation of gibberellins. *Plant Growth Regul* 3: 127-140.
- Knoll KA, Short KC, Curtis IS, Power JB, Davey JB (1997) Shoot regeneration from cultured root explants of spinach (*Spinacia oleracea* L.): a system for *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep* 17: 96-101.
- Ko KW, Lin F, Katsumata T, Sugai Y, Miyazaki S, Kawaide H, Okada K, Nojiri H, Yamane H (2008) Functional identification of a rice ent-kaurene oxidase, OsKO2, using the *Pichia pastoris* expression system. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 3285-3288.
- Kobayashi M, Yamaguchi I, Murofushi N, Ota Y, Takahashi N (1988) Fluctuation and localization of endogenous gibberellins in rice. *Agric Biol Chem* 52: 1189-1194.
- Kochba J, Spiegel-Roy P, Neumann H, Saad S (1978) Stimulation of embryogenesis in *Citrus* ovular callus by ABA, ethephon, CCC and Alar and its suppression by GA₃. *Z Pflanzenphysiol* 89: 427-432.

- Kohnen MV, Schmid-Siegert E, Trevisan M, Petrolati LA, Sénéchal F, Müller-Moulé P, Maloof J, Xenarios I, Fankhauser C (2016) Neighbor detection induces organ-specific transcriptomes, revealing patterns underlying hypocotyl-specific growth. *Plant Cell* 28: 2889-2904.
- Kolodziejek I, Waleza M, Mostowska A (2003) Ultrastructure of mesophyll cells and pigment content in senescing leaves of maize and barley. *J Plant Growth Regul* 22: 217-227.
- Koltunow AM, Grossniklaus U (2003) Apomixis: a developmental perspective. *Ann Rev Plant Biol Plant* 54: 547-574.
- Komai F, Okuse I, Harada T (1995) Histological identification of somatic embryogenesis from excised root tissues of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Tiss Cult Lett* 12: 313-315.
- Komai F, Okwe I, Harada T (1996a) Somatic embryogenesis and plant regeneration in culture of root segments of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Sci* 113: 203-208.
- Komai F, Okuse I, Harada T (1996b) Effective combinations of plant growth regulators for somatic embryogenesis from spinach root segments. *J Japan Soc Hort Sci* 65: 559-564.
- Komai F, Okuse I, Saga K, Harada T (1996c) Improvement on the efficiency of somatic embryogenesis from spinach root tissues by applying various sugars. *J Jpn Soc Sci* 65: 67-72.
- Kondo K, Nadamitsu S, Tanaka R, Taniguchi K (1991) Micropropagation of *Spinacia oleracea* L. through culture of shoot primordia. *Plant Tiss Cult Lett* 8: 1-4.
- Kong SG, Okajima K (2016) Diverse photoreceptors and light responses in plants. *J Plant Res* 129: 111-114.
- Kothari SL, Agarwal K, Kumar S (2004) Inorganic nutrient manipulation for highly improved plant regeneration in finger millet—*Eleusine coracana* (L.) Gaertn. *Cell Dev Biol Plant* 40: 515-519.
- Kudęłko K, Gaj MD (2019) Glutathione (GSH) induces embryogenic response in *in vitro* cultured explants of *Arabidopsis thaliana* via auxin-related mechanism. *Plant Growth Regul* 89: 25-36.
- Kulinska-Lukaszek K, Tobojka M, Adamiok A, Kurczyńska E (2012) Expression of the *BBM* gene during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Biol Plantarum* 56: 389-394.
- Kumar P, Lakshmi NJ, Mani VP (2000) Interactive effects of salicylic acid and phytohormones on photosynthesis and grain yield of soybean (*Glycine max* L. Merrill). *Physiol Mol Biol Plants* 6: 179-186.
- Kumar P (2003) Photosynthetic and yield response of pea (*Pisum sativum* L.) to foliar application of salicylic acid and phytohormones in Uttaranchal hills. *J Indian Bot Soc* 82: 67-73.
- Kumar S, Ghatty S, Satyanarayana J, Guha A, Chaitanya BSK, Reddy AR (2012) Paclobutrazol treatment as a potential strategy for higher seed and oil yield in field-grown *Camelina sativa* L. Crantz. *BMC Res Notes* 5: 137.
- Kumar V, Jha P, Van Staden J (2020) *LEAFY COTYLEDONS* (*LECs*): master regulators in plant embryo development. *Plant Cell Tiss Org Cult* 140: 475-487.
- Kurczyńska EU, Gaj MD, Ujczak A, Mazur E (2007) Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 226: 619-628.
- Kurczyńska EU, Potocka I, Dobrowolska I, Kulinska-Lukaszek K, Sala K, Wrobel J (2012) Cellular markers for somatic embryogenesis. In: Sato KI (ed.) *Embryogenesis*. In Tech, Rijeka, Croatia, pp. 307-332.

- Lakshmi Sita G, Raghava Ram NV, Vaidyanathan CS (1979) Differentiation of embryoids and plantlets from shoot callus of sandalwood. *Plant Sci Lett* 15: 265-270.
- Lau OS, Deng XW (2012) The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci* 17: 584-593.
- Laux T, Mayer KFX, Berger J, Jürgens G (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122: 87-96.
- Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd NP, Peng J (2002) Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is upregulated following imbibition. *Genes Dev* 16: 646-658.
- Lee DJ, Zeevaart JA (2002) Differential regulation of RNA levels of gibberellin dioxygenases by photoperiod in spinach. *Plant Physiol* 130: 2085-9458.
- Lee H, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2003) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2152-2156.
- Lee DJ, Zeevaart JA (2005) Molecular cloning of *GA2-oxidase3* from spinach and its ectopic expression in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol* 138: 243-254.
- Lee DJ, Zeevaart JAD (2007) Regulation of *gibberellin 20-oxidase1* expression in spinach by photoperiod. *Planta* 226: 35-44.
- Lee ST, Huang WL (2013) Cytokinin, auxin, and abscisic acid affects sucrose metabolism conduce to *de novo* shoot organogenesis in rice (*Oryza sativa* L.) callus. *Bot Stud* 54: 5.
- Lechner E, Achard P, Vansiri A, Potuschak T, Genschik P (2006) F box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol* 9: 631-638.
- Ledwon A, Gaj MD (2011) *LEAFY COTYLEDON1*, *FUSCA3* expression and auxin treatment in relation to somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul* 65: 157-167.
- Leshem B, Ronen R, Soudry E, Lurie S, Gepstein S (1995) Cytokinin and white light coact to enhance polypeptide metabolism and shoot regeneration in cultured melon cotyledons. *J Plant Physiol* 145: 291-295.
- Le Strange M, Koike S, Valencia J, Chaney W (2003) Spinach production in California. Publication 7212. Vegetable Research and Information Center, Division of Agriculture and Natural Resources, University of California, Davis.
- Leljak D, Jelaska S (1995) Callus formation and somatic embryo production in pumpkin *Cucurbita pepo* L. explants on hormonefree medium. *Period Biol* 97: 327-332.
- Leljak-Levanić D, Bauer N, Mihaljević S, Jelaska S (2004a) Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): control of somatic embryo development by nitrogen compounds. *J Plant Physiol* 161: 229-236.
- Leljak-Levanić D, Bauer N, Mihaljević S, Jelaska S (2004b) Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Rep* 23: 120-127.
- Leljak-Levanić D, Mihaljević S, Jelaska S (2009) Variations in DNA methylation in *Picea omorika* (Panč) Purk. embryogenic tissue and the ability for embryo maturation. *Propag Ornament Plants* 9: 3-9.

- Leon P, Sheen J (2003) Sugar and hormone connections. *Trends Plant Sci* 8: 110-116.
- Lever BG, Shearing SJ, Batch JJ (1982) PP333-a new broad spectrum growth retardant: In: *British Crop Protection Conference – Weeds*, Vol. 1: British Crop Protection Council Publ., Croydon, UK, pp. 3-10.
- Li B, Wolyn DJ (1995) The effects of ancymidol, abscisic acid, uniconazole and paclobutrazol on somatic embryogenesis of asparagus. *Plant Cell Rep* 14: 529-533.
- Li B, Wolyn DJ (1997) Interaction of ancymidol with sucrose and α -naphthaleneacetic acid in promoting asparagus (*Asparagus officinalis* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 16: 879-883.
- Li HM, Xu ZG, Tang CM (2010) Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 103: 155-163.
- Li L, Ljung K, Breton G, Schmitz RJ, Pruneda-Paz J, Cowing-Zitron C, Cole BJ, Ivans LJ, Pedmale UV, Jung HS, Ecker JR, Kay SA, Chory J (2012a) Link in photoreceptor rexcitation to changes in plant architecture. *Genes Dev* 26: 785-790.
- Li QF, Wang C, Jiang L, Li S, Sun SS, He JX (2012b) An interaction between BZR1 and DELLAs mediates direct signaling crosstalk between brassinosteroids and gibberellins in *Arabidopsis*. *Sci Signal* 5: ra72.
- Li JR, Zhuang FY, Ou CG, Hu H, Zhao ZW, Mao JH (2013) Microspore embryogenesis and production of haploid and doubled haploid plants in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 112: 275-287.
- Li H, Soriano M, Cordewener J, Muiño JM, Riksen T, Fukuoka H, Angenent GC, Boutilier K (2014) The histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes totipotency in the male gametophyte. *Plant Cell* 26: 195-209.
- Li L, Sheen J (2016) Dynamic and diverse sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol* 33: 116-125.
- Li K, Yu R, Fan LM, Wei N, Chen H, Deng XW (2016) DELLA-mediated PIF degradation contributes to coordination of light and gibberellin signalling in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 7: 11868.
- Li H, Torres-Garcia J, Latrasse D, Benhamed M, Schilderink S, Zhou W, Kulikova O, Hirt H (2017) Bisseling, Plant-specific histone deacetylases HDT1/2 regulate *GIBBERELLIN 2-OXIDASE2* expression to control *Arabidopsis* root meristem cell number. *Plant Cell* 29: 2183-2196.
- Li J, Wang M, Li Y, Zhang Q, Lindsey K, Daniell H, Jin S, Zhang X (2019a) Multi-omics analyses reveal epigenomics basis for cotton somatic embryogenesis through successive regeneration acclimation process. *Plant Biotechnol J* 17: 435-450.
- Li C, Zheng L, Wang X, Hu Z, Zheng Y, Chen Q, Hao X, Xiao X, Wang X, Wang G, Zhang Y (2019b) Comprehensive expression analysis of *Arabidopsis GA2-oxidase* genes and their functional insights. *Plant Sci* 285: 1-13.
- Liao YK, Liao CK, Ho YL (2008) Maturation of somatic embryos in two embryogenic cultures of *Picea morrisonicola* Hayata as affected by alternation of endogenous IAA content. *Plant Cell Tiss Org Cult* 93: 257-268.

- Liebisch HW (1974) Uptake, translocation and metabolism of GA₃ glucosyl ester. In: Schreiber K, Schütte HR, Sembdner G (eds.) Biochemistry and chemistry of plant growth regulators. Halle, GDR: Inst of Plant Biochem pp. 109-113.
- Lim TS, Chitra TR, Tay BH, Pua EC, Yu H (2008) Molecular characterization of *Arabidopsis* and *Brassica juncea* Cu/Zn-superoxide dismutases reveals their regulation of shoot regeneration. J Plant Growth Regul 27: 99-109.
- Lin C, Yang H, Guo H, Mockler T, Chen J, Cashmore AR (1998) Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis seedlings* by a blue light receptor cryptochrome 2. Proc Natl Acad Sci USA 95: 2686-2690.
- Lin CS, Lin CC, Chang WC (2004) Effect of thidiazuron on vegetative tissue-derived somatic embryogenesis and flowering of bamboo *Bambusa edulis*. Plant Cell Tiss Org Cult 76: 75-82.
- Lin Y, Li J, Li B, He T, Chun Z (2011) Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. Plant Cell Tiss Org Cult 105: 329-335.
- Lombardi-Crestana S, da Silva Azevedo M, Ferreira e Silva GF, Pino LE, Appezzato-da-Glória B, Figueira A, Nogueira FTS, Peres LEP (2012) The tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) natural genetic variation *Rgl* and the *DELLA* mutant *procera* control the 450 competence necessary to form adventitious roots and shoots. J Exp Bot 63: 5689-5703.
- Lipavská H, Konrádová H (2004) Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. In Vitro Cell Dev Biol Plant 40: 23-30.
- Liu CM, Xu ZH, Chua NH (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. Plant Cell 5: 621-630.
- Liu C, Moon K, Honda H, Kobayashi T (2001) Enhanced regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic callus by light irradiation I growth phase. J Biosci Bioeng 91: 319-321.
- Liu C, Lin Z, Zhang X (2012) Unbiased genomic distribution of genes related to cell morphogenesis in cotton by chromosome mapping. Plant Cell Tiss Org Cult 108: 529-534.
- Liu Y, Fang Y, Huang M, Jin Y, Sun J, Tao X, Zhang G, He K, Zhao Y, Zhao H (2015) Uniconazole-induced starch accumulation in the bioenergy crop duckweed (*Landoltia punctata*) II: transcriptome alterations of pathways involved in carbohydrate metabolism and endogenous hormone crosstalk. Biotechnol Biofuels 8: 64.
- Liu X, Yang S, Yu CW, Chen CY, Wu K (2016) Histone acetylation and plant development. Enzymes 40: 173-199.
- Liu Z, Ge XX, Qiu WM, Long JM, Jia HH, Yang W, Dutt M, Wu XM, Guo WW (2018a) Overexpression of the *CsFUS3* gene encoding a B3 transcription factor promotes somatic embryogenesis in *Citrus*. Plant Sci 277: 121-131.
- Liu QY, Guo GS, Qiu ZF, Li XD, Zeng BS, Fan CJ (2018b) Exogenous GA₃ application altered morphology, anatomic and transcriptional regulatory networks of hormones in *Eucalyptus grandis*. Protoplasma 255: 1107-1119.
- Livak KJ, Schmittgen, TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. Methods 25: 402-408.

- Löfke C, Zwiewka M, Heilmann I, Van Montagu MC, Teichmann T, Friml J (2013) Asymmetric gibberellin signaling regulates vacuolar trafficking of PIN auxin transporters during root gravitropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 3627-3632.
- Lotan T, Ohto MA, Yee KM, West MA, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93: 1195-1205.
- LoSchiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Vergara R, Orselli S, Terzi M (1989) DNA methylation of embryonic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones, and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet* 77: 325-331.
- Loss-Morais G, Turchetto-Zolet AC, Etges M, Cagliari A, Körbes AP, Maraschin FS, Margis-Pinheiro M, Margis M (2013) Analysis of castor bean ribosome-inactivating proteins and their gene expression during seed development. *Genet Mol Biol* 36: 74-86.
- Lou H, Kako S (1995) Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Sci Hortic* 64: 11-20.
- Loyola-Vargas VM (2016) The history of somatic embryogenesis. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds.) *Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications*. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 11-22.
- Luo Y, Koop H (1997) Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos and leaf protoplasts of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Planta* 202: 387-396.
- Luo YC, Zhou H, Li Y, Chen JY, Yang JH, Chen YQ, Qu LH (2006) Rice embryogenic calli express a unique set of miRNAs, suggesting regulatory roles of miRNAs in plant post-embryonic development. *FEBS Lett* 580: 5111-5116.
- Ma Q, Hedden P, Zhang Q (2011) Heterosis in rice seedlings: its relationship to gibberellin content and expression of gibberellin metabolism and signaling genes. *Plant Physiol* 156: 1905-1920.
- Ma L, Li G (2019) Auxin-dependent cell elongation during the shade avoidance response. *Front Plant Sci* 10: 914.
- Maeda N, Matsubara K, Yoshida H, Mizushima Y (2011) Anti-cancer effect of spinach glycolipids as angiogenesis inhibitors based on the selective inhibition of DNA polymerase activity. *Mini Rev Med Chem* 11: 32-38.
- Magnus V, Ozga JA, Reinecke DM, Pierson GL, Larue TA, Cohen JD, Brenner ML (1997) 4-chloroindole-3-acetic acid in *Pisum sativum*. *Phytochem* 46: 675-681.
- Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Oda K (2008) The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, *GA2ox7*, under high-salinity stress in *Arabidopsis*. *Plant J* 56: 613-626.
- Mahdavi-Darvari F, Noor NM, Ismanizan I (2015) Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 120: 407-422.
- Maheswaran G, Williams EG (1986) Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* *in vitro*. *Ann Bot* 56: 619-630.

- 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 Physiol Biochem* 47: 743-752.
- Malabadi R, Van Staden J (2006) Cold-enhanced induction and maturation of somatic embryos from intact megagametophyte explants in *Pinus patula* is mediated by calcium. *S Afr J Bot* 72: 613-618.
- Malik MR, Wang F, Dirpaul JM, Zhou N, Polowick PL, Ferrie AMR, Krochko JE (2007) Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 144: 134-154.
- Maluta FA, Bordignon SR, Rossi ML, Ambrosano GMB, Rodrigues PHV (2013) *In vitro* culture of sugarcane exposed to different light sources. *Pesqui Agropecu Bras* 48: 1303-1307.
- Mao Z, He S, Xu F, Wei X, Jiang L, Liu Y, Wang W, Li T, Xu P, Du S, Li L (2020) Photoexcited CRY1 and phyB interact directly with ARF6 and ARF8 to regulate their DNA binding activity and auxin-induced hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *New Phytol* 225: 848-865.
- Marín-de la Rosa N, Sotillo B, Miskolczi P, Gibbs DJ, Vicente J, Carbonero P, Oñate-Sánchez L, Holdsworth MJ, Bhalerao R, Alabadí D, Blázquez MA (2014) Large-scale identification of gibberellin-related transcription factors defines group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as functional DELLA partners. *Plant Physiol* 166: 1022-1032.
- Marín-de la Rosa N, Pfeiffer A, Hill K, Locascio A, Bhalerao RP, Miskolczi P, Grønlund AL, Wanchoo-Kohli A, Thomas SG, Bennett MJ, Lohmann JU, Blázquez MA, Alabadí D (2015) Genome wide binding site analysis reveals transcriptional coactivation of cytokinin-responsive genes by DELLA proteins. *PLoS Genet* 11: e1005337.
- Martin DN, Proebsting WM, Parks TD, Dougherty WG, Lange T, Lewis MJ, Gaskin P, Hedden P (1996) Feedback regulation of gibberellin biosynthesis and gene expression in *Pisum sativum* L. *Planta* 200: 159-166.
- Marks PA, Breslow R (2007) Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone inhibitor an anticancer drug. *Nat Biotechnol* 25: 84-90.
- Márquez-López RE, Pérez-Hernández CA, Kú-González Á, Galaz-Ávalos RM, Loyola-Vargas VM (2018) Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Protoplasma* 255: 695-708.
- Matsuo S, Nanya K, Imanishi S, Honda I, Goto E (2018) Effects of blue and red lights on gibberellin metabolism in tomato seedlings. *Hortic J* 88: 76-82.
- Matsushita A, Furumoto T, Ishida S, Takahashi Y (2007) AGF1, an AT-hook protein, is necessary for the negative feedback of *AtGA3ox1* encoding GA3-oxidase. *Plant Physiol* 143: 1152-1162.
- Maury S, Sow MD, LeGac AL, Genitoni J, Lafon-Placette C, Mozgova I (2019) Phytohormone and chromatin crosstalk: The missing link for developmental plasticity? *Front Plant Sci* 10: 395.
- Mawphlang OIL, Kharshing EV (2017) Photoreceptor mediated plant growth responses: implications for photoreceptor engineering toward improved performance in crops. *Front Plant Sci* 8: 1181.
- Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jurgens G, Laux T (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95: 805-815.

- Mc Manus JFA, Mowry RW (1960) Staining methods. In: Hoerber PB (ed.) Histology and histochemistry. Harper and Row, New York, USA, pp. 275-276.
- Meinke DW, Franzmann LH, Nickle TC, Yeung EC (1994) Leafy cotyledon mutants of *Arabidopsis*. Plant Cell 6: 1049-1064.
- Méndez-Hernández HA, Ledezma-Rodríguez M, Avilez-Montalvo RN, Juárez-Gómez YL, Skeete A, Avilez-Montalvo J, De-la-Peña C, Loyola-Vargas VM (2019) Signaling overview of plant somatic embryogenesis. Front Plant Sci 10: 77.
- Michalczuk L, Cooke TJ, Cohen JD (1992) Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. Phytochemistry 31: 1097-1103.
- Miguel C, Marum L (2011) An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. J Exp Bot 62: 3713-3725.
- Milić M, Savić J, Tubić L, Devrnja N, Čalić D, Zdravković-Korać S, Milojević M (2017) Expression of the gene for ribosome-inactivating protein, *SoRIP2*, as a tool for the evaluation of somatic embryogenesis in spinach. Plant Cell Tiss Org Cult 129: 483-491.
- Milojević J, Tubić Lj, Zdravković-Korać S, Dragičević I, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B (2011) Increased regeneration capacity in spinach lines obtained by *in vitro* self-fertilisation. Sci Hortic 130: 681-690.
- Milojević J, Tubić L, Nolić V, Mitić N, Čalić-Dragosavac D, Vinterhalter B, Zdravković-Korać S (2012a) Hygromycin promotes somatic embryogenesis in spinach. Plant Cell Tiss Org Cult 109: 573-579.
- Milojević J, Tubić Lj, Pavlović S, Mitić N, Čalić D, Vinterhalter B (2012b) Long days promote somatic embryogenesis in spinach. Sci Hortic 142: 32-37.
- Milojević J (2015) Ekspresija gena za ribozom-inaktivirajući protein (*SoRIP2*) kao marker za analizu embriogenog potencijala spanaća (*Spinacia oleracea* L. cv. Matador) *in vitro*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija pp. 1-185.
- Mitchum MG, Yamaguchi S, Hanada A, Kuwahara A, Yoshioka Y, Kato T, Tabata S, Kamiya Y, Sun TP (2006) Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development. Plant J 45: 804-818.
- Mitsuhashi W, Toyomasu T, Masui H, Katho T, Nakaminami K, Kashiwagi Y, Akutsu M, Kenmoku H, Sassa T, Yamaguchi S, Kamiya Y, Kamada H (2003) Gibberellin is essentially required for carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis: dynamic regulation of gibberellin 3-oxidase gene expressions. Biosci Biotech Biochem 11: 2438-2447.
- Mo M, Yokawa K, Wan Y, Baluška F (2015) How and why do root apices sense light under the soil surface? Front Plant Sci 6: 775.
- Moeller SM, Jacques PF, Blumberg JB (2000) The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. J Am Coll Nutr 19: 522S-527S.
- Mohamed GF, Agamy RA, Rady MM (2011) Ameliorative effects of some antioxidants on water-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants. J Appl Sci Res 7: 2470-2478.
- Moltrasio R, Robredo CG, Gómez MC, Díaz Paleo AH, Díaz DG, Rios RD, Franzone PM (2004) Alfalfa (*Medicago sativa*) somatic embryogenesis: genetic control and introduction of favourable alleles into elite *Argentinean* germplasm. Plant Cell Tiss Org Cult 77: 119-124.

- Molvig L, Rose RJ (1994) A regeneration protocol for *Spinacia oleracea* using gibberellic acid. *Aust J Bot* 42: 763-769.
- Moni A, Lee AY, Briggs WR, Han IS (2015) The blue light receptor Phototropin 1 suppresses lateral root growth by controlling cell elongation. *Plant Biol* 17: 34-40.
- Moradi S, Dianati Daylami S, Arab M, Vahdati K (2017) Direct somatic embryogenesis in *Epipactis veratrifolia*, a temperate terrestrial orchid. *J Hortic Sci Biotechnol* 92: 88-97.
- Morelock TE, Correll JC (2008) Spinach. In: Prohens J, Nuez F (ed.) *Handbook of plant breeding. Vegetables I*. Springer, New York, USA, pp. 189-218.
- Moritz T, Philipson J, Odén PC (1990) Quantitation of gibberellins A1, A3, A4, A9 and a putative conjugate in grafts of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) during the period of shoot elongation. *Plant Physiol* 93: 1476-1481.
- Morrone D, Chen X, Coates RM, Peters RJ (2010) Characterization of the kaurene oxidase CYP701A3, a multifunctional cytochrome P450 from gibberellin biosynthesis. *Biochem J* 431: 337-344.
- Motte H, Vercauteren A, Depuydt S, Landschoot S, Geelen D, Werbouck S, Goormachtig S, Vuylsteke M, Vereecke D (2014) Combining linkage and association mapping identifies *RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE1* as an essential *Arabidopsis* shoot regeneration gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 8305-8310.
- Moubayidin L, Perilli S, Dello Ioio R, Di Mambro R, Costantino P, Sabatini S (2010) The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Curr Biol* 20: 1138-1143.
- Mozgová I, Muñoz-Viana R, Hennig L (2017) PRC2 represses hormone-induced somatic embryogenesis in vegetative tissue of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 13: e1006562.
- Mujib A, Ali M, Tonk D, Isah T, Zafar N (2016) Embryogenesis in ornamental monocots: plant growth regulators as signaling element. In: Mujib A (ed.) *Somatic embryogenesis in ornamentals and its applications*. Springer, New York, USA, pp. 187-201.
- Muktadir MA, Habib MA, Milan MAK, Akhond MAY (2016) Regeneration efficiency based on genotype, culture condition and growth regulators of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Agric Nat Resour* 50: 38-42.
- Müller-Moulé P, Nozue K, Pytlak ML, Palmer CM, Covington MF, Wallace AD, Harmer SL, Maloof JN (2016) *YUCCA* auxin biosynthetic genes are required for *Arabidopsis* shade avoidance. *Peer J* 4: e2574.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473-497.
- Murovec J, Bohanec B (2012) Haploids and doubled haploids in plant breeding. In: Abdurakhmonov I, (ed.) *Plant breeding. In Tech*, Rijeka, Croatia, pp. 87-106.
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1995) Thidiazuron induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiol Plant* 94: 268-276.
- Nadeau R, Rapaport L (1974) An amphoteric conjugate of [³H] gibberellin A1 from barley aleurone layers. *Plant Physiol* 54: 809-812.

- Nakagawa H, Saijyo T, Yamauchi N, Shigyo M, Kako S, Ito A (2001) Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. *Sci Hortic* 90: 85-92.
- Nakaminami K, Sawada Y, Suzuki M, Kenmoku H, Kawaide H, Mitsunashi W, Sassa T, Inoue Y, Kamiya Y, Toyomasu T (2003) Deactivation of gibberellin by 2-oxidation during germination of photoblastic lettuce seeds. *Biosci Biotech Biochem* 67: 1551-1558.
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H (2006) Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* 140: 411-432.
- Nakayama I, Miyazawa T, Kobayashi M, Kamiya Y, Abe H, Sakurai A (1990) Effects of a new plant growth regulator prohexadione calcium (BX-112) on shoot elongation caused by exogenously applied gibberellins in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Cell Physiol* 31: 195-200.
- Nameth B, Dinka SJ, Chatfeld SP, Morris A, English J, Lewis D, Oro R, Raizada MN (2013) The shoot regeneration capacity of excised *Arabidopsis* cotyledons is established during the initial hours after injury and is modulated by a complex genetic network of light signalling. *Plant Cell Environ* 36: 68-86.
- Negin B, Shemer O, Sorek Y, Williams LE (2017) Shoot stem cell specification in roots by the WUSCHEL transcription factor. *PLoS One* 12: e0176093.
- Nelissen H, Rymen B, Jikumaru Y, Demuynck K, Van Lijsebettens M, Kamiya Y, Inzé D, Beemster GTS (2012) Local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Curr Biol* 22: 1183-1187.
- Nelson DC, Riseborough JA, Flematti GR, Stevens J, Ghisalberti EL, Dixon KW, Smith SM (2009) Karrikins discovered in smoke trigger arabidopsis seed germination by a mechanism requiring gibberellic acid synthesis and light. *Plant Physiol* 149: 863-873.
- Nešković M, Radojević Lj (1973) The growth of and morphogenesis in tissue cultures of *Spinacia oleracea* L. *Bull Inst Jard Bot Univ Beograd* 8: 35-37.
- Nguyen QV, Sun HJ, Boo KH, Lee D, Lee JH, Lim PO, Lee HY, Riu KZ, Lee DS (2013) Effect of plant growth regulator combination and culture period on *in vitro* regeneration of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Biotechnol Rep* 7: 99-108.
- Nhut DT, Takamura T, Watanabe H, Okamoto K, Tanaka M (2003) Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell Tiss Org Cult* 73: 43-52.
- Niazian M, Shariatpanahi ME (2020) *In vitro*-based doubled haploid production: recent improvements. *Euphytica* 216: 69.
- Nic-Can GI, López-Torres A, Barredo-Pool FA, Wrobel K, Loyola-Vargas VM, Rojas-Herrera R, De-la-Peña C (2013) New insights into somatic embryogenesis: LEAFYCOTYLEDON1, BABYBOOM1 and WUSCHEL- RELATED HOMEODOMAIN4 are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS ONE* 8: e72160.
- Nic-Can GI, Avilez-Montalvo JR, Avilez-Montalvo RN, Márquez-López RE, Mellado-Mojica E, Galaz-Ávalos RM, Loyola-Vargas VM (2016) The relationship between stress and somatic embryogenesis, In: Loyola-Vargas VM, Alejo NO (eds.) *Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications*. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 151-170.

- Nieves N, Sagarra F, González R, Lezcano Y, Cid M, Blanco MA, Castillo R (2008) Effect of exogenous arginine on sugarcane (*Saccharum* sp.) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and proline. *Plant Cell Tiss Org Cult* 95: 313-320.
- Nishimura A, Ashikari M, Lin S, Takashi T, Angeles ER, Yamamoto T, Matsuoka M (2005) Isolation of a rice regeneration quantitative trait locigene and its application to transformation systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11940-11944.
- Nishiwaki M, Fujino K, Koda Y, Masuda K, Kikuta Y (2000) Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. *Planta* 211: 756-759.
- Nitsch JP (1969) Experiment androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphol* 19: 389-404.
- Nivedithadevi D, Somasundaram R, Pannerselvam R (2015) Effect of abscisic acid, paclobutrazol and salicylic acid on the growth and pigment variation in *Solanum trilobatum* (l). *Int J Drug Dev Res* 4: 236-246.
- Nodine MD, Bartel DP (2010) MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Gene Dev* 24: 267-2692.
- Nojiri H, Toyomasu T, Yamane H, Shibaoka H, Murofushi N (1993) Qualitative and quantitative analysis of endogenous gibberellins in onion plants and their effects on bulb development. *Biosci Biotech Biochem* 57: 2031-2035.
- Nolan KE, Saeed NA, Rose RJ (2006) The stress kinase gene *MtSKI* in *Medicago truncatula* with particular reference to somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 25: 711-722.
- Nolan KE, Kurdyukov S, Rose R (2009) Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTORLIKE KINASE1 (SERK1)* gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* 60: 1759-1771.
- Nolan KE, Kurdyukov S, Rose RJ (2011) Characterisation of the legume *SERK-NIK* gene superfamily including splice variants: Implications for development and defence. *BMC Plant Biol* 11: 44.
- Noma M, Huber J, Ernst D, Pharis R (1982) Quantitation of gibberellins and the metabolism of [³H] gibberellin A1 during somatic embryogenesis in carrot and anise cell cultures. *Planta* 155: 369-376.
- Nowak K, Gaj MD (2016) Transcription factors in the regulation of somatic embryogenesis. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds.) *Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications*. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 53-79.
- Nowicka A, Juzoń K, Krzewska M, Dziurka M, Dubas E, Kopeć P, Zieliński K, Żur I (2019) Chemically-induced DNA de-methylation alters the effectiveness of microspore embryogenesis in triticale. *Plant Sci* 287: 110189.
- Ochatt SJ (2017) The role of stress on unravelling of somatic embryogenesis competence. *Acta Hort* 1155: 1-14.
- Ogas J, Cheng CJ, Sung SR, Somerville C (1997) Cellular differentiation regulated by gibberellin in *Arabidopsis thaliana* *pickle* mutant. *Science* 227: 417-423.

- Ogas J, Kaufmann S, Henderson J, Somerville C (1999) PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 96: 13839-13844.
- Ogawa M, Kusano T, Katsumi M, Sano H (2000) Rice gibberellin insensitive gene homolog, *OsGAI*, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. Gene 245: 21-29.
- Oh E, Kim J, Park E, Kim JI, Kang C, Choi G (2004) PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 16: 3045-3058.
- Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I, Lee HS, Sun TP, Kamiya Y, Choi G (2007) PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the *GAI* and *RGA* promoters in *Arabidopsis* seeds. Plant Cell 19: 1192-1208.
- Oh E, Zhu JY, Bai MY, Arenhart RA, Sun Y, Wang ZY (2014) Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the *Arabidopsis* hypocotyl. eLife 27: 3e03031.
- Okazaki Y, Takahata S, Hirakawa H, Suzuki Y, Onodera Y (2019) Molecular evidence for recent divergence of X- and Y-linked gene pairs in *Spinacia oleracea* L. PLoS ONE 14: 470.
- Oldach KH, Morgenstern A, Rother S, Girgi M, O'Kennedy M, Lorz H (2001) Efficient *in vitro* plant regeneration from immature zygotic embryos of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br] and *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Plant Cell Rep 20: 416-421.
- Olsen JE, Moritz T, Jensen E, Junttila O (1994) Comparison of endogenous gibberellins in roots and shoots of elongating *Salix pentandra* seedlings. Physiol Plant 90: 378-381.
- Olszewski N, Sun TP, Gubler F (2002) Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. Plant Cell 14: 61-80.
- Omar MS, Novak FJ (1990) *In vitro* plant regeneration and ethylmethanesulphonate (EMS) uptake in somatic embryos of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Plant Cell Tiss Org Cult 20: 185-190.
- O'Neill DP, Ross JJ, Reid JB (2000) Changes in gibberellins A1 levels and response during de-etiolation of pea seedlings. Plant Physiol 124: 805-812.
- O'Neill DP, Davidson SE, Clarke VC, Yamauchi Y, Yamaguchi S, Kamiya Y, Reid JB, Ross JJ (2010) Regulation of the gibberellin pathway by auxin and DELLA proteins. Planta 232: 1141-1149.
- Opio P, Tomiyama H, Saito T, Ohkawa K, Ohara H, Kondo S (2020) Paclobutrazol elevates auxin and abscisic acid, reduces gibberellins and zeatin and modulates their transporter genes in Marubakaido apple (*Malus prunifolia* Borkh. var. ringo Asami) rootstocks. Plant Physiol Biochem 155: 502-511.
- Orłowska A, Kępczyńska E (2018) Identification of Polycomb Repressive Complex1, Trithorax group genes and their simultaneous expression with *WUSCHEL*, *WUSCHEL*-related Homeobox5 and SHOOT MERISTEMLESS during the induction phase of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* Gaertn. Plant Cell Tiss Org Cult 134: 345-356.
- Orłowska A, Kępczyńska E (2020a) Oxidative status in *Medicago truncatula* Gaertn. Non-embryogenic and embryogenic tissues with particular reference to somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss Org Cult 140: 35-48.

- Orłowska A, Kępczyńska E (2020b) Involvement of O₂•⁻ in the regulation of *Polycomb*, *Trithorax* and *LEC1, LIL, WUS, WOX5, STM* gene expression during somatic embryogenesis induction in *M. truncatula*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 142: 201-212.
- Osorio-Montalvo P, Sáenz-Carbonell L, De-la-Peña C (2018) 5-Azacytidine: a promoter of epigenetic changes in the quest to improve plant somatic embryogenesis. *Int J Mol Sci* 19: 3182-3202.
- Osorio-Montalvo P, De-la-Peña C, Oropeza C, Nic-Can G, Córdova-Lara I, Castillo-Castro E, Sáenz-Carbonell L (2020) A peak in global DNA methylation is a key step to initiate the somatic embryogenesis of coconut palm (*Cocos nucifera* L). *Plant Cell Rep* 39: 1345-1357.
- Ozga JA, Reinecke DM, Ayele BT, Ngo P, Nadeau C, Wickramarathna AD (2009) Developmental and hormonal regulation of gibberellin biosynthesis and catabolism in pea fruit. *Plant Physiol* 150: 448-462.
- Öztekin GB, Uludağ T, Tüzel Y (2018) Growing spinach (*Spinacia oleracea* L.) in a floating system with different concentrations of nutrient solution. *Appl Ecol Env Res* 16: 3333-3350.
- Pan S, Rasul F, Li W, Tian H, Mo Z, Duan M, Tang X (2013) Roles of plant growth regulators on yield, grain qualities and antioxidant enzyme activities in super hybrid rice (*Oryza sativa* L.). *Rice* 6: 9.
- Panaia M, Senaratna T, Dixon KW Sivasithamparam K (2004) The role of cytokinins and thidiazuron in the stimulation of somatic embryogenesis in key members of the *Restionaceae*. *Aust J Bot* 52: 257-267.
- Pandey D, Sing AK, Chaudhary B (2012) Boron-mediated plant somatic embryogenesis: a provocative model. *J Bot* 375829.
- Papadakis AK, Siminis CI, Roubelakis-Angelakis KA (2001) Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. *Plant Physiol* 126: 434-444.
- Paparelli E, Parlanti S, Gonzali S, Novi G, Mariotti L, Ceccarelli N, van Dongen JT, Kölling K, Zeeman SC, Perata P (2013) Nighttime sugar starvation orchestrates gibberellin biosynthesis and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25: 3760-3769.
- Park SY, Yeung EC, Paek KY (2010) Endoreduplication in *Phalaenopsis* is affected by light quality from light-emitting diodes during somatic embryogenesis. *Plant Biotechnol Rep* 4: 303-309.
- Park J, Lee N, Kim W, Lim S, Choi G (2011) ABI3 and PIL5 collaboratively activate the expression of *SOMNUS* by directly binding to its promoter in imbibed *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 23: 1404-1415.
- Park J, Oh DH, Dassanayake M, Nguyen KT, Ogas J, Choi G, Sun TP (2017) Gibberellin signaling requires chromatin remodeler PICKLE to promote vegetative growth and phase transitions. *Plant Physiol* 173: 1463-1474.
- Parvin S, Javadi T, Ghaderi N (2015) Proline, protein, RWC and MSI contents affected by paclobutrazol and water deficit treatments in strawberry cv. Paros. *Cercetari Agronom Moldova* 161: 107-114.
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D, Fehér A (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast derived cells of alfalfa. *Plant Physiol* 129: 1807-1819.

- Patnaik D, Mahalakshmi A, Khurana P (2005) Effect of water stress and heavy metals on induction of somatic embryogenesis in wheat leaf base cultures. *Indian J Exp Biol* 43: 740-745
- 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 Tiss Org Cult* 113: 397-406.
- Pedmale UV, Huang SS, Zander M, Cole BJ, Hetzel J, Ljung K, Reis PAB, Sridevi P, Nito K, Nery JR, Ecker JR, J Chory J (2016) Cryptochromes interact directly with PIFs to control plant growth in limiting blue light. *Cell* 164: 233-245.
- Pelletier JM, Kwong RW, Park S, Le BH, Baden R, Cagliari A, Hashimoto M, Munoz MD, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2017) LEC1 sequentially regulates the transcription of genes involved in diverse developmental processes during seed development. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: E6710-E6719.
- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP (1997) The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* 11: 3194-3205.
- Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F, Sudhakar D, Christou P, Snape JW, Gale MD, Harberd NP (1999) 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400: 256-261.
- Peng C, Gao F, Wang H, Shen H, Yang L (2021) Optimization of maturation process for somatic embryo production and cryopreservation of embryogenic tissue in *Pinus koraiensis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 144:185-194.
- Pérez-Pascual D, Jiménez-Guillen D, Villanueva-Alonzo H, Souza-Perera R, Godoy-Hernández G, Zúñiga-Aguilar JJ (2018) Ectopic expression of the *Coffea canephora* SERK1 homolog-induced differential transcription of genes involved in auxin metabolism and in the developmental control of embryogenesis. *Physiol Plantarum* 163: 530-551.
- Pescador R, Kerbauy GB, de Melo Ferreira W, Purgatto E, Suzuki RM, Guerra MP (2012a) A hormonal misunderstanding in *Acca sellowiana* embryogenesis: levels of zygotic embryogenesis do not match those of somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul* 68: 67-76.
- Pescador R, Kerbauy GB, Fraga HPF, Hamasaki RM, Tavares LBB, Guerra MP (2012b) Dynamics of free and ³H-labelled glutamine concentrations during zygotic and somatic embryogenesis of Feijoa [*Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret]. *J Hortic Sci Biotechnol* 87: 583-587.
- Petrášek J, Friml J (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* 136: 2675-2688.
- Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NEJ, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P (1995) Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 108: 1049-1057.
- Phinney BO (1984) Gibberellin A₁, dwarfism and the control of shoot elongation in higher plants. In: Crozier A, Hillman JR (eds.) *The biosynthesis and metabolism of plant hormones*. Cambridge Univ Press, Cambridge, UK, pp. 17-41.
- Pierik R, de Wit M (2014) Shade avoidance: Phytochrome signalling and other aboveground neighbour detection cues. *J Exp Bot* 65: 2815-2824.

- Pila Quinga LA, de Freitas Fraga HP, do Nascimento Vieira L, Guerra MP (2017) Epigenetics of long-term somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L.: DNA methylation and recovery of embryogenic potential. *Plant Cell Tiss Org Cult* 131: 295-305.
- Pilarska M, Malec P, Salaj J, Bartnicki F, Konieczny R (2016) High expression of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE* coincides with initiation of various developmental pathways in vitro culture of *Trifolium nigrescens*. *Protoplasma* 253: 345-355.
- Pimenta-Lange MJ, Knop N, Lange T (2012) Stamen-derived bioactive gibberellin is essential for male flower development of *Cucurbita maxima* L. *J Exp Bot* 63: 2681-2691.
- Pimenta-Lange MJ, Liebrandt A, Arnold L, Chmielewska SM, Felsberger A, Freier E, Heuer M, Zur D, Lange T (2013) Functional characterization of gibberellin oxidases from cucumber, *Cucumis sativus* L. *Phytochemistry* 90: 62-69.
- Pimenta-Lange MJ, Lange T (2015) Touch-induced changes in *Arabidopsis* morphology dependent on gibberellin breakdown. *Nat Plants* 1: 14025.
- Piskurewics U, Jikumaru Y, Kinoshita N, Nambara E, Kamiya Y, Lopez-Molina L (2008) The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* 20: 2729-2745.
- Plackett AR, Thomas SG, Wilson ZA, Hedden P (2011) Gibberellin control of stamen development: A fertile field. *Trends Plant Sci* 10: 568-578.
- Plackett AR, Powers SJ, Fernandez-Garcia N, Urbanova T, Takebayashi Y, Seo M, Jikumaru Y, Benlloch R, Nilsson O, Ruiz-Rivero O, Phillips AL, Wilson ZA, Thomas SG, Hedden P (2012) Analysis of the developmental roles of the *Arabidopsis* gibberellin 20-oxidases demonstrates that *GA20ox1*, -2, and -3 are the dominant paralogs. *Plant Cell* 24: 941-960.
- Plackett ARG, Wilson ZA (2016) Gibberellins and plant reproduction. In: Hedden P, Thomas SG (eds.) *Ann Plant Rev*, Vol. 49: Gibberellins. John Wiley & Sons, Hoboken, pp: 323-358.
- Podolec R, Ulm R (2018) Photoreceptor-mediated regulation of the COP1/SPA E3 ubiquitin ligase. *Curr Opin Plant Biol* 45: 18-25.
- Polito VS, McGranahan G, Pinney K, Leslie C (1989) Origin of somatic embryos from repetitively embryogenic cultures of walnut (*Juglans regia* L.): Implications for *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant Cell Rep* 8: 219-221.
- Popelka JC, Altpeter F (2003) Evaluation of rye (*Secale cereale* L.) inbred lines and their crosses for tissue culture response and stable genetic transformation of homozygous rye inbred line L22 by biolistic gene transfer. *Theor Appl Genet* 107: 583-590.
- Possart A, Fleck C, Hiltbrunner A (2014) Shedding (far-red) light on phytochrome mechanisms and responses in land plants. *Plant Sci* 217-218: 36-46.
- Potts WC (1982) Internode length in *Pisum*. The effect of the *Le/le* gene difference on endogenous gibberellin like substances. *Physiol Plantarum* 55: 323-328.
- Powell W (1990) Environmental and genetical aspects of pollen embryogenesis. In: Bajaj YPS (ed.) *Haploids in crop improvement*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 45-65.
- Preece JE (1995) Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? *Plant Tiss Cult Biotechnol* 1: 26-37.

- Priyono, Florin B, Rigoreau M, Ducos JP, Sumirat U, Mawardi S, Lambot C, Broun P, Pétiard V, Wahyudi T, Crouzillat D (2010) Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. *Plant Cell Rep* 29: 343-357.
- Prudente DO, de Souza L Paiva R (2019) Plant somatic embryogenesis: Modulatory role of oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci* 90: 483-487.
- Pueschel AK, Schwenkel HG, Winkelmann T (2003) Inheritance of the ability for regeneration via somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 72: 43-51.
- Pullman GS, Mein J, Johnson S, Zhang Y (2005a) Gibberellin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Rep* 23: 596-605.
- Pullman GS, Johnson S, Van Tassel S, Zhang Y (2005b) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation with MES pH buffer, biotin, and folic acid. *Plant Cell Tiss Org Cult* 80: 91-103.
- Qiu L, Chen R, Luo H, Fan Y, Huang X, Liu J, Xiong F, Zhou H, Gan CK, Wu JM, Li RY (2019) Effects of exogenous GA₃ and DPC treatments on levels of endogenous hormone and expression of key gibberellin biosynthesis pathway genes during stem elongation in sugarcane. *Sugar Tech* 21: 936-948.
- Quintana-Escobar AO, Nic-Can GI, Galaz Avalos RM, Loyola-Vargas VM, Gongora-Castillo E (2019) Transcriptome analysis of the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora* and the participation of *ARF* and *Aux/IAA* genes. *Peer J* 7: e7752.
- Quiroz-Figueroa FR, Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 86: 285-301.
- Rademacher W (1992) Biochemical effects of plant growth retardants. In: Dekker M (ed.) *Plant biochemical regulators*. Gausmann HW, New York, USA, pp. 169-199.
- Rademacher W (1997) Bioregulation of crop plants with inhibitors of gibberellin biosynthesis. *Proc Plant Growth Regul Soc Am* 24: 27-31.
- Rademacher W (2000) Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 501-531.
- Rademacher W (2016) Chemical regulators of gibberellin status and their application in plant production. In: Hedden P, Thomas SG (eds.) *Gibberellins*. *Ann Plant Rev*, Vol 49, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, USA pp. 359-404.
- Radhakrishnan T, Murthy TG K, Chandran K Bandyopadhyay A (2001) Somatic embryogenesis in *Arachis hypogea*: revisited. *Aust J Bot* 49: 753-759.
- Radi A, Lange T, Niki T, Koshioka H, Pimenta-Lange MJ (2006) Ectopic expression of pumpkin gibberellin oxidase alters gibberellin biosynthesis and development of transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* 140: 528-536.
- Radley M (1956) Occurrences of substances similar to gibberellic acid in higher plants. *Nature* 178: 1070-1071.
- Radoeva T, Weijers D (2014) A roadmap to embryo identity in plants. *Trends Plant Sci* 19 : 709-716.

- Rady M, Gaballah S (2012) Improving barley yield grown under water stress conditions. *Res J Recent Sci* 1: 1-6.
- Raghavan V (2004) Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: Cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *Ann Bot* 91: 1743-1756.
- Rahman H, Khan M, Hussain SI, Mahmood T, Shah A (1989a) Effect of paclobutrazol on growth and yield of pepper. *Pakistan J Agric Res* 10: 53-55.
- Rahman H, Khan M, Khokhar M (1989b) Effect of paclobutrazol on growth and yield of tomato. *Pakistan J Agric Res* 10: 49-51.
- Rahman ARMM, Islam MO, Prodhan AKMA, Ichihashi S (2004) Effects of complex organic extracts on plantlet regeneration from PLBs and plantlet growth in the *Doritaenopsis orchid*. *JARQ* 37: 229-235.
- Rahman ZA, Ali MSM, Ghazalli MN, Awang K (2018) Optimization of culture media formulations for micropropagation of *Lepisanthes fruticosa*. *Biosci Biotechnol Res Asia* 15: 51-58.
- Rajasekaran K, Hein MB, Vasil IK (1987) Endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf explants of *Pennisetum purpureum* Schum. *Plant Physiol* 84: 47-51.
- Rakshit S, Rashid Z, Sekhar JC, Fatma T, Dass S (2010) Callus induction and whole plant regeneration in elite Indian maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Plant Cell Tiss Org Cult* 100: 481 31-37.
- Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG, Bautista-Aguilar JR (2016) The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar Tech* 19: 331-336.
- Rausenberger J, Tscheuschler A, Nordmeier W, Wüst, F, Timmer J, Schäfer E, Fleck C, Hiltbrunner A (2011) Photoconversion and nuclear trafficking cycles determine phytochrome A's response profile to far-red light. *Plant Cell* 146: 813-825.
- Reed JW, Wu MF, Reeves PH, Hodgens C, Yadav V, Hayes S, Pierik R (2018) Three auxin response factors promote hypocotyl elongation. *Plant Physiol* 178: 864-875.
- Reid JB, Botwright NA, Smith JJ, O'Neill DP, Kerckhoffs LHJ (2002) Control of gibberellin levels and gene expression during de-etiolation in pea. *Plant Physiol* 128: 734-741.
- Reinert J (1958) Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus carotten. *Naturwissenschaften* 45: 344-345.
- Renukdas N, Mohan ML, Khuspe SS, Rawal SK (2003) Influence of boron on somatic embryogenesis in papaya. *Biol Plantarum* 47: 129-132.
- Reuveni M, Evenor D (2007) On the effect of light on shoot regeneration in petunia. *Plant Cell Tiss Org Cult* 89: 49-54.
- Reyes-Díaz Ji, Arzate-Fernández AM, Piña-Escutia JL, Norman-Mondragón TH (2020) The effect of inositol, pyridoxine and thiamine on somatic embryogenesis of *Agave angustifolia*. *Trop Subtrop Agroecosys* 23: 01.

- Rieu I, Eriksson S, Powers SJ, Gong F, Griffiths J, Woolley L, Benlloch R, Nilsson O, Thomas SG, Hedden P, Phillips AL (2008) Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 2420-2436.
- Rider SD, Henderson JTJ, Dean Rider S, Henderson JTJ, Jerome RE, Edenberg HJ, Romero-Severson J, Ogas J (2003) Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in *Arabidopsis*. *Plant J* 35: 33-43.
- Rinaldi LMR (1999) Factors affecting shoot regeneration from zygotic embryo and seedling explants of *Cycas revoluta* Thunb. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 35: 25-28.
- Rippmann JF, Michalowski CB, Nelson DE, Bohnert HJ (1997) Induction of a ribosome-inactivating protein upon environmental stress. *Plant Mol Biol* 35: 701-709.
- Rizza A, Walia A, Lanquar V, Frommer W, Jones A (2017) *In vivo* gibberellin gradients visualized in rapidly elongating tissues. *Nature Plants* 3: 803-813.
- Rizza A, Jones AM (2018) The makings of a gradient: spatiotemporal distribution of gibberellins in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 47: 9-15.
- Robert HS, Grones P, Stepanova AN, Robles LM, Lokerse AS, Alonso JM, Weijers D, Friml J (2013) Local auxin sources orient the apical-basal axis in *Arabidopsis* embryos. *Curr Biol* 23: 2506-2512.
- Roberts JL, Moreau R (2016) Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food Funct* 8: 3307-3640.
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, da Silva LC, Oton WC (2012) Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant Cell Tiss Org Cult* 111: 69-78.
- Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Ann Rev Plant Biol* 57: 837-858.
- Romero-Puertas MC, McCarthy I, Gómez M, Sandalio LM, Corpas FJ, del Río LA, Palma JM (2004) Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Cell Environ* 27: 1135-1148.
- Rood SB, Mandel R, Pharis RP (1989) Endogenous gibberellins and shoot growth and development in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 89: 269-273.
- Rose RJ, Mantiri FR, Kurdyukov S, Chen SK, Wang XD, Nolan KE, Sheahan MB (2010) Developmental biology of somatic embryogenesis. In: Pua EC, Davey MR (eds.) *Plant developmental biology-biotechnological perspectives*. Springer, Berlin Heidelberg, Germany, pp. 3-26.
- Rose RJ (2019) Somatic embryogenesis in the *Medicago truncatula* model: cellular and molecular mechanisms. *Front Plant Sci* 10: 267.
- Ross JJ, O'Neill DP, Smith JJ, Kerckoffs LHJ, Elliott RC (2000) Evidence that auxin promotes gibberellin A₁ biosynthesis in pea. *Plant J* 21: 547-552.
- Ross JJ, O'Neill DP, Rathbone DA (2003) Auxin-gibberellin interactions in pea: integrating the old with the new. *J Plant Growth Regul* 22: 99-108.

- Ross JJ, Weston DE, Davidson SE, Reid JB (2011) Plant hormone interactions: how complex are they? *Physiol Plantarum* 141: 299-309.
- Ross JJ, Miraghazadeh A, Beckett A H, Quittenden LJ, McAdam EL (2016) Interactions between gibberellin and other hormones. In: Hedden P, Thomas SG (eds.) *Gibberellins*. *Ann Plant Rev*, Vol 49, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, USA, pp. 229-252.
- Rosspopoff O, Chelysheva L, Saffar J, Lecorgne L, Gey D, Caillieux E, Colot V, Roudier F, Hilson P, Berthomé R, Da Costa M, Rech P (2017) Direct conversion of root primordium into shoot meristem relies on timing of stem cell niche development. *Development* 144: 1187-1200.
- Rothkegel K, Sandoval P, Soto E, Ulloa L, Riveros A, Lillo-Carmona V, Cáceres-Molina J, Almeida AM, Meneses C (2020) Dormant but active: chilling accumulation modulates the epigenome and transcriptome of *Prunus avium* during bud dormancy. *Front Plant Sci* 11: 1115.
- Roustan J-P, Latché A, Fallot J (1994) Role of ethylene on induction and expression of carrot somatic embryogenesis: relationship with polyamine metabolism. *Plant Sci* 103: 223-229.
- Rubio-Somoza I, Weigel D (2011) Micro RNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends Plant Sci* 16: 258-264.
- Ruduś I, Kępczyńska E, Kępczyński J (2002) Regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis by gibberellins. *Plant Growth Regul* 36: 91-95.
- Ruduś I, Weiler EW, Kępczyńska E (2009) Do stress-related phytohormones, abscisic acid and jasmonic acid play a role in the regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis? *Plant Growth Regul* 59: 159.
- Sabana AA, Rajesh MK, Antony G (2020) Dynamic changes in the expression pattern of miRNAs and associated target genes during coconut somatic embryogenesis. *Planta* 251: 79.
- Sagare AP, Lee YL, Lin TC, Chen CC, Tsay HS (2000) Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (*Fumaraceae*) – a medicinal plant. *Plant Sci* 160: 139-147.
- Sah AK, Raj S, Khatik GL, Vyas M (2017) Nutritional profile of spinach and its antioxidant and antidiabetic evaluation. *Int J Clin Pharm* 11: 03.
- Sahasrabudhe NA, Nandi M, Bahulikar RA (1999) Influence of boric acid on somatic embryogenesis of a cytotsterile line of indica rice. *Plant Cell Tiss Org Cult* 58: 73-75.
- Sahrawat AK, Chand S (1999) Stimulatory effect of copper on plant regeneration in indica rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Physiol* 154: 517-522.
- Saitou T, Kamada H, Harada H (1992) Light requirement for shoot regeneration in horseradish hairy roots. *Plant Physiol* 99: 1336-1341.
- Sakai WS (1973) Simple method for diferential staining of parain embedded plant material using toluidine blue. *Stain Technol* 48: 247-249.
- Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal GK, Takeda S, Abe K, Miyao A, Hirochika H, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol* 134: 1642-1653.

- Salazar-Cerezo S, Martínez-Montiel N, García-Sánchez J, Pérez-Y-Terrón R, Martínez-Contreras RD (2018) Gibberellin biosynthesis and metabolism: a convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiol Res* 208: 85-98.
- Salisbury FJ, Hall A, Grierson CS, Halliday KJ (2007) Phytochrome coordinates *Arabidopsis* shoot and root development. *Plant J* 50: 429-438.
- Salo HM, Sarjala T, Jokela A, Häggman H, Vuosku J (2016) Moderate stress responses and specific changes in polyamine metabolism characterize Scots pine somatic embryogenesis. *Tree Physiol* 36: 392-402.
- Salvo S, Cook J, Carlson AR, Hirsch CN, Kaeppler SM, Kaeppler HF (2018) Genetic fine-mapping of a quantitative trait locus (QTL) associated with embryogenic tissue culture response and plant regeneration ability in maize. *Plant Genome* 11: 1-11.
- Sankar B, Jaleel CA, Manivannan P, Kishorekumar A, Somasundaram R, Panneerselvam R (2007) Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through antioxidants and free radical scavenging enzymes in *Arachis hypogaea* L. *Colloid Surface B* 60: 229-235.
- Sankhala A, Davis TD, Sankhla N, Upadhyaya A, Joshi S (1992) Influence of growth regulators on somatic embryogenesis, plantlet regeneration, and post-transplant survival of *Echinonchla frumentaceae*. *Plant Cell Rep* 11: 368-371.
- Sankhla D, Davis TD, Sankhla N, Upadhyaya A (1993) Effects of gibberellin biosynthesis inhibitors on shoot regeneration from hypocotyl explants of *Albizia julibrissin* Plant Cell Rep 13: 115-118.
- Sanmartín-Suárez C, Soto-Otero R, Sánchez-Sellero I, Méndez-Álvarez E (2011) Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. *J Pharmacol Toxicol Method* 63: 209-215.
- Santa-Catarina C, de Oliveira RR, Cutri L, Floh EI, Dornelas MC (2012) *WUSCHEL*-related genes are expressed during somatic embryogenesis of the basal angiosperm *Ocotea catharinensis* Mez. (*Lauraceae*). *Trees* 26: 493-501.
- Santamaria P (2006) Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *J Sci Food Agric* 86: 10-17.
- Santarem ER, Pelissier B, Finer JJ (1997) Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33: 13-19.
- Santos MO, Romano E, Yotoko KSC, Tinoco MLP, Dias BBA, Aragão FJL (2005) Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (*SERK*) gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Sci* 168: 723-729.
- Sassi M, Lu Y, Zhang Y, Wang J, Dhonukshe P, Blilou I, Dai M, Li J, Gong X, Jaillais Y, Yu X, Traas J, Ruberti I, Wang H, Scheres B, Vernoux T, Xu J (2012) COP1 mediates the coordination of root and shoot growth by light through modulation of PIN1- and PIN2-dependent auxin transport in *Arabidopsis*. *Development* 139: 3402-3412.
- Sassi M, Wang J, Ruberti I, Vernoux T, Xu J (2013) Shedding light on auxin movement: Light-regulation of polar auxin transport in the photocontrol of plant development. *Plant Signal Behav* 8: e23355.

- Sasaki A, Itoh H, Gomi K, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Jeong DH, An G, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M (2003) Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299: 1896-1898.
- Sauter M, Mekhedov SL, Kende H (1995) Gibberellin promotes histone H1 kinase activity and the expression of *cdc2* and *cyclin* genes during the induction of rapid growth in deepwater rice internodes. *Plant J* 7: 623-632.
- Sawada Y, Katsumata T, Kitamura J, Kawaide H, Nakajima M, Asami T, Nakaminami K, Kurahashi T, Mitsuhashi W, Inoue Y, Toyomasu T (2008) Germination of photoblastic lettuce seeds is regulated via the control of endogenous physiologically active gibberellin content rather than of gibberellin responsiveness. *J Exp Bot* 59: 3383-3393.
- Sechrest L, Yeaton WH (1982) Magnitude of experimental effects in social science research. *Evaluation Rev* 6: 579-600.
- Schaefer J (1985) Regeneration in alfalfa tissue culture. *Plant Physiol* 79: 584-589.
- Schenk R, Hildenbrandt A (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204.
- Schavemaker CM, Jacobsen E (1995) Development of a cyclic somatic embryogenesis regeneration system for leek (*Allium ampeloprasum* L.) using zygotic embryos. *Plant Cell Rep* 14: 227-231.
- Schiavone FM, Cooke TJ (1987) Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. *Cell Differ* 21: 53-62.
- Schliemann W, Schaller B, Jensen E, Schneider G (1993) Native gibberellin-Oglucosides from mature seeds of *Phaseolus coccineus*. *Phytochemistry* 35: 35-38.
- Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124: 2049-2062.
- Schneider G, Schliemann W (1994) Gibberellin conjugates: an overview. *Plant Growth Regul* 15: 247-260.
- Schuettengruber B, Martinez AM, Iovino N, Cavalli G (2011) Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 799-814.
- Seesangboon A, Grunec L, Pokawattana T, Eungwanichayapant PD, Tovanarante J, Popluechai S (2018) Transcriptome analysis of *Jatropha curcas* L. flower buds responded to the paclobutrazol treatment. *Plant Physiol Biochem* 127: 276-286.
- Seguí-Simarro JM, Nuez F (2008) Pathways to doubled haploidy: Chromosome doubling during androgenesis. *Cytogen Gen Res* 120: 358-369.
- Seguí-Simarro JM (2010) Androgenesis revisited. *Bot Rev* 76: 377-404.
- Senns B, Fuchs P, Schneider G (1998) GC-MS quantification of gibberellin A20-13-O-glucoside and gibberellin A8-2-O-glucoside in developing barley caryopses. *Phytochemistry* 48: 1275-1280.
- Serrani JC, Ruiz-Rivero O, Fos M, García-Martínez, JL (2008) Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *Plant J* 56: 922-934.

- Shani E, Weinstain R, Zhang Y, Castillejo C, Kaiserli E, Chory J, Tsien RY, Estelle M (2013) Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of *Arabidopsis* root. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 4834-4839.
- Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A (2006) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiol Plantarum* 127: 519-534.
- Shen Y, Wei W, Zhou DX (2015) Histone acetylation enzymes coordinate metabolism and gene expression. *Trends Plant Sci* 20: 614-621.
- Shin KS, Murthy HN, Heo JW, Hahn EJ, Paek KY (2008) The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. *Acta Physiol Plant* 30: 339-343.
- Shin AY, Han YJ, Baek A, Ahn T, Kim SY, Nguyen TS, Son M, Lee KW, Shen Y, Song PS, Kim JI (2016) Evidence that phytochrome functions as a protein kinase in plant light signalling. *Nat Commun* 7: 11545.
- Shimoda Y, Ito H, Tanaka A (2016) *Arabidopsis STAY-GREEN*, Mendel's green cotyledon gene, encodes magnesium-dechelataase. *Plant Cell* 28: 2147-2160.
- Shinomura T, Nagatani A, Chory J, Furuya M (1994) The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A. *Plant Physiol* 104: 363-371.
- Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Kubota M, Watanabe M, Furuya M (1996) Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8129-8133.
- Shiraiwa N, Kikuchi K, Honda I, Shigyo M, Yamazaki H, Tanaka D, Tanabe K, Itai A (2012) Characterization of endogenous gibberellins and molecular cloning of a putative *gibberellin 3-oxidase* gene in bunching onion. *J Amer Soc Hort Sci* 136: 382-388.
- Shmykova N, Domblides E, Vjurtts T, Domblides A (2021) Haploid embryogenesis in isolated microspore culture of carrots (*Daucus carota* L.). *Life* 11: 20.
- Shohag MJI, Wei YY, Yu N, Zhang J, Wang K, Patring J, He Z, Yang X (2011) Natural variation of folate content and composition in spinach (*Spinacia oleracea*) germplasm. *J Agric Food Chem* 59: 12520-12526.
- Shuai H, Meng Y, Luo X, Chen F, Zhou W, Dai Y (2017) Exogenous auxin represses soybean seed germination through decreasing the gibberellin/abscisic acid (ga/aba) ratio. *Sci Rep* 7: 12620.
- Si-Ammour A, Windels D, Arn-Boulidoires E, Kutter C, Ailhas J, Meins F, Vazquez F (2011) miR393 and secondary siRNAs regulate expression of the TIR1/AFB2 auxin receptor clade and auxin-related development of *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 157: 683-691.
- Siddiqui ZH, Abbas ZK, Ansari MW, Khan MN (2019) The role of miRNA in somatic embryogenesis. *Genomics* 111: 1026-1033.
- Silva AT, Barduche D, Do Livramento KG, Paiva LV (2015) A putative *BABYBOOM-like* gene (*CaBBM*) is expressed in embryogenic calli and embryogenic cell suspension culture of *Coffea arabica* L. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 51: 93-101.
- Silva MMA, de Oliveira ALB, Oliveira-Filho RA, Camara T, Willadino L, Gouveia-Neto A (2016) The effect of spectral light quality on *in vitro* culture of sugarcane. *Acta Sci Biol Sci* 38: 157-161.

- Silverstone AL, Chang CW, Krol E, Sun TP (1997) Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene *GAI* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 12: 9-19.
- Singh A, Singh S, Panigrahi KCS, Reski R, Sarkar AK (2014) Balanced activity of microRNA166/165 and its target transcripts from the class III homeodomain-leucine zipper family regulates root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 33: 1-9.
- Singh A, Khurana P (2017) Ectopic expression of *Triticum aestivum* *SERK* genes (*TaSERKs*) control plant growth and development in *Arabidopsis*. *Sci Rep* 7: 12368.
- Singh M, Kaur M, Bakshi M, Kapurwan S, Kumar A (2017) Copper and zinc induced amelioration of *in vitro* multiplication of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) Nees. *Indian J For* 40: 181-184.
- Singh V, Sergeeva L, Ligterink W, Aloni R, Zemach H, Doron-Faigenboim A, Yang J, Zhang P, Shabtai S, Firon N (2019) Gibberellin promotes sweetpotato root vascular lignification and reduces storage-root formation. *Front Plant Sci* 10: 1320.
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* 11: 118-131.
- Smertenko A, Bozhkov PV (2014) Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. *J Exp Bot* 65: 1343-1360.
- Smith DL, Krikorian AD (1989) Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryogenic cultures in hormone-free medium. *Am J Bot* 76: 1834-1845.
- Smith DL, Krikorian AD (1990a) pH control of carrot somatic embryogenesis. In: Nijkamp HJJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J (eds.) *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 449-453.
- Smith DL, Krikorian AD (1990b) Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. *Plant Cell Rep* 9: 34.
- Smith DL, Krikorian AD (1991) Growth and maintenance of an embryogenic cell culture of daylily (*Heimerocallis*) on hormone free medium. *Ann Bot* 67: 443-445.
- Smith DL, Krikorian AD (1992) Low external pH prevents cell elongation but not multiplication of embryogenic carrot cells. *Physiol Plantarum* 84: 495-501.
- Smith VA, Knatt CJ, Gaskin P, Reid JB (1992) The distribution of gibberellins in vegetative tissues of *Pisum sativum* L. I. Biological and biochemical consequences of the /e mutation. *Plant Physiol* 99: 368-371.
- Solís MT, El-Tantawy AA, Cano V, Risueño MC, Testillano PS (2015) 5-Azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. *Front Plant Sci* 6: 472.
- Somssich M, Je BI, Simon R, Jackson D (2016) CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development* 143: 3238-3248.
- Song X, Han Y, Teng W, Sun G, Li W (2010) Identification of QTL underlying somatic embryogenesis capacity of immature embryos in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Cell Rep* 29: 125-131.

- Sopher CR, Krol M, Huner NPA, Moore AE, Fletcher RA (1999) Chloroplastic changes associated with paclobutrazol induced stress protection in maize seedlings. *Can J Bot* 77: 279-290.
- Souza NM, Topham AT, Bassel GW (2017) Quantitative analysis of the 3D cell shape changes driving soybean germination. *J Exp Bot* 68: 1531-1537.
- Spiegel-Roy P, Kochba J (1980) Role of polyembryony and apomixis in *Citrus* propagation and breeding. In: Fiechter A (ed.) *Advances in biochemical engineering*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 28-48.
- Sponsel VM (1995) The biosynthesis and metabolism of gibberellins in higher plants. In: Davies PJ (ed.) *Plant hormones*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 66-97.
- Sponsel V, Schmidt F, Porter S, Nakayama M, Kohlstruck S, Estelle M (1997) Characterization of new gibberellin-responsive semidwarf mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 115: 1009-1020.
- Sponsel VM, Hedden P (2004) Gibberellin biosynthesis and inactivation. In: PJ Davies (ed.) *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 63-94.
- Sponsel VM, Hedden P (2010) Gibberellin biosynthesis and inactivation. In: Davies PJ (ed.) *Plant hormones*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 63-94.
- Srivastava LM (2002) *Plant growth and development. Hormones and environment*. 1st edn., Academic Press, San Diego, USA, pp. 1-772.
- Stasolla C, Kong L, Yeung EC, Thorpe TA (2002) Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38: 93-105.
- Stavang JA, Moe R, Olsen JE, Junttila O (2007) Differential temperature regulation of GA metabolism in light and darkness in pea. *J Exp Bot* 58: 3061-3069.
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W (2005) Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17: 616-627.
- Steiner N, Santa-Catarina C, Guerra M, Cutri L, Dornelas M, Floh E (2012) A gymnosperm homolog of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1 (SERK1)* is expressed during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 109: 41-50.
- Stephan M, Bangerth F, Schneider G (2001) Transport and metabolism of exogenously applied gibberellins to *Malus domestica* Borkh. Cv. Jonagold. *Plant Growth Regul* 33: 77-85.
- Steward FC, Mapes MO, Smith J (1958) Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. *Am J Bot* 45: 707-708.
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2001) *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11806-11811.
- Stone SL, Braybrook SA, Paula SL, Kwong KW, Meuser J, Pelletier J, Hsieh TF, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (2008) *Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2* induces maturation traits and auxin activity: implications for somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3151-3156.

- Su YH, Zhao XY, Liu YB, Zhang CL, O'Neill SD, Zhang XS (2009) Auxin-induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 59: 448-460.
- Su YH, Liu YB, Bai B, Zhang XS (2015) Establishment of embryonic shoot-root axis is involved in auxin and cytokinin response during *Arabidopsis* somatic embryogenesis. *Front Plant Sci* 5:1-9.
- Subhash GP, Virbhadrappa SR, Vasant OK (2010) *Spinacia oleracea* linn: a pharmacognostic and pharmacological overview. *Int J Res Ayurveda Pharm* 1: 78-84.
- Subotić A, Jevremović S, Trifunović M, Petrić M, Milošević S, Grubišić D (2009) The influence of gibberellic acid and paclobutrazol on induction of somatic embryogenesis in wild type and hairy root cultures of *Centaureum erythraea* Gillib. *Afr J Biotechnol* 8: 3223-3228.
- Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM (2010) *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell* 18: 463-471.
- Sugimoto K, Gordon SP, Meyerowitz EM (2011) Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends Cell Biol* 21: 212-218.
- Sugimoto K, Temman H, Kadokura S, Matsunaga S (2019) To regenerate or not to regenerate: factors that drive plant regeneration. *Curr Opin Plant Biol* 47: 138-150.
- Sun YL, Hong SK (2010) Effects of plant growth regulators and L-glutamic acid on shoot organogenesis in the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 100: 317-328.
- Sun H, Pang BY, Yan J, Wang, T, Wang LN, Chen CH, Li Q, Ren, ZH (2018) Comprehensive analysis of cucumber gibberellin oxidase family genes and functional characterization of *CsGA20ox1* in root development in *Arabidopsis*. *Int J Mol Sci* 19: 3135.
- Sun R, Wang S, Ma D, Li Y, Liu C (2019) Genome-wide analysis of cotton auxin early response gene families and their roles in somatic embryogenesis. *Genes* 10: 10.
- Suzuki M, Wang HH, McCarty DR (2007) Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 genes. *Plant Physiol* 143: 902-911.
- Syahputra BSA, Sinniah UR, Ismail MR, Swamy MK (2016) Optimization of paclobutrazol concentration and application time for increased lodging resistance and yield in field-grown rice. *Philippine Agric Sci* 99: 221-228.
- Szewczyk-Taranek B, Pawłowska B (2015) Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration from seedlings of *Hepatica nobilis* Schreb. *Plant Cell Tiss Org Cult* 120: 1203-1207.
- Szyrajew K, Bielewicz D, Dolata J, Wójcik AM, Nowak K, Szczygieł-Sommer A, Szweykowska Kulinska Z, Jarmolowski A, Gaj MD (2017) MicroRNAs are intensively regulated during induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 8: 1-16.
- Tahiliani S, Kothari SL (2004) Increased copper content of the medium improves plant regeneration from immature embryo derived callus of wheat (*Triticum aestivum*). *J Plant Biochem Biotechnol* 13: 85-88.
- Tai I, Zhang Y, Jørgensen M, Pisanty O, Barbosa IC, Zourelidou M, Regnault T, Crocoll C, Olsen CE, Weinstain R, Schwechheimer C, Halkier BA, Nour-Eldin HH, Estelle M, Shani E (2016) The *Arabidopsis* NPF3 protein is a GA transporter. *Nat Commun* 7: 11486.

- Talla ST, Madam E, Manga S, Aileni M, Mamidala P (2018) Efficient TDZ-induced regeneration from capitulum explants of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker F. – an ornamental plant with high aesthetic value. *Plant Biosyst* 153: 679-685.
- Talon M, Zeevaart JAD (1990) Gibberellins and stem growth as related to photoperiod in *Silene armeria* L. *Plant Physiol* 92: 1094-1100.
- Talon M, Tadeo FR, Zeevaart JAD (1991a) Cellular changes induced by exogenous and endogenous gibberellins in shoot tips of the long day plant *Silene armeria*. *Planta* 185: 487-493.
- Talon M, Zeevaart JAD, Gage DA (1991b) Identification of gibberellins in spinach and effects of light and darkness on their levels. *Plant Physiol* 97: 1521-1526.
- Takahashi N, Kitamura H, Kawarada A, Seta Y, Takai M, Tamura S, Sumiki Y (1955) Biochemical studies on “Bakanae” fungus. Part XXXIV. Isolation of gibberellins and their properties. *Bull Agric Chem Soc Jpn* 19: 267-281.
- Tanaka S, Mochizuki N, Nagatani A (2002) Expression of the *AtGH3a* gene, an *Arabidopsis* homologue of the soybean *GH3* gene, is regulated by phytochrome B. *Plant Cell Physiol* 43: 281-289.
- Tao H, Gao D, Li F, Guang G, Lan Ying Z (2002) Effect of gibberellic acid and its synthetic inhibitors on shoot regeneration from epicotyl of *Citrus grandis*. *Plant Physiol Comm* 38: 559-560.
- Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, Cheng Y, Lim J, Zhao Y, Ballaré CL, Sandberg G, Noel JP, Chory (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133: 164-176.
- Tchorbadjieva MI (2016) Advances in proteomics of somatic embryogenesis. In: Mujib A (ed.) *Somatic embryogenesis in ornamentals and its applications*. Springer, India, pp. 67-90.
- Thakare D, Tang W, Hill K, Perry SE (2008) The MADS-domain transcriptional regulator AGAMOUS-LIKE15 promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiol* 146: 1663-1672.
- Thibaud-Nissen F, Shealy RT, Khanna A, Vodkin LO (2003) Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiol* 132: 118-136.
- Thomas W, Hoffmann F, Potrycus I, Wenzel G (1976) Protoplast regeneration and stem embryogenesis of haploid androgenic rape. *Mol Gen Genet* 145: 245-247.
- Thomas SG, Phillips AL, Hedden P (1999) Molecular cloning and functional expression of *gibberellin 2-oxidases*, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4698-4703.
- Thomas C, Bronner R, Molinier J, Prinsen E, Van Onckelen H, Hahne G (2002) Immuno-cytochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflower embryos. *Planta* 215: 577-583.
- Thomas C, Meyer D, Hember C, Steinmetz A (2004) Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiol Biochem* 42: 35-42.

- Thomas C, Jiménez VM (2005) Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects. *Plant Cell Monogr* 2: 157-175.
- Thorpe TA (2000) Somatic embryogenesis: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *Korean J Plant Tiss Cult* 27: 245-258.
- Titapiwatanakun B, Murphy AS (2009) Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *J Exp Bot* 60: 1093-1107.
- Tisserat B, Murashige T (1977a) Probable identity of substances in citrus that repress asexual embryogenesis. *In Vitro* 13: 785-789.
- Tisserat B, Murashige T (1977b) Repression of asexual embryogenesis *in vitro* by some plant growth regulators. *In Vitro* 13: 799-805.
- Tittmann S, Borner M, Harst M, Bleser E (2015) Influence of led-illumination to the regeneration potential of somatic embryos of *Vitis vinifera* 'Chardonnay' – preliminary studies. *Acta Hort* 1083: 445-453.
- Tokuji Y, Kuriyama K (2003) Involvement of gibberellin and cytokinin in the formation of embryogenic cell clumps in carrot (*Daucus carota*). *J Plant Physiol* 160: 133-141.
- Toonen MAJ, Hendriks T, Schmidt EDL, Verhoeven HA, Van Kammen A, de Vries SC (1994) Description of somatic embryo forming single-cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* 194: 565-572.
- Toyomasu T, Kawaide H, Mitsuhashi W, Inoue Y, Kamiya Y (1998) Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seed. *Plant Physiol* 118: 1517-1523.
- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143: 606-616.
- Tuan PA, Kumar R, Rehal PK, Toora PK, Ayele BT (2018) Molecular mechanisms underlying abscisic acid/gibberellin balance in the control of seed dormancy and germination in cereals. *Front Plant Sci* 9: 668.
- Tubić Lj, Anačkov G, Milojević J, Ghalawenji N, Mitić N, Igić R, Zdravković-Korać S (2014) High variability in the tissue culture response of root-tips of *Allium ascalonicum* individuals and optimization of the regeneration procedure. *Plant Cell Tiss Org Cult* 118: 101-110.
- Ubeda-Tomás S, Federici F, Casimiro I, Beemster GTS, Bhalerao R, Swarup R, Doerner P, Haseloff J, Bennett MJ (2009) Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Curr Biol* 19: 1194-1199.
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M (2005) *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437: 693-698.
- Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Katoh E, Ohmiya H, Asano K, Saji S, Hongyu X, Ashikari M, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M (2007) Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell* 19: 2140-2155.
- Unterholzner SJ, Rozhon W, Papacek M, Ciomas J, Lange T, Kugler KG, Mayer KF, Sieberer T, Poppenberger B (2015) Brassinosteroids are master regulators of gibberellin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27: 2261-2272.

- Upreti KK, Reddy YTN, Prasad SRS, Bindu GV, Jayaram HL, Rajan S (2013) Hormonal changes in response to paclobutrazol induced early flowering in mango cv. Totapuri. *Sci Hortic* 150: 414-418.
- Urbanová T, Tarkowská D, Novák O, Hedden P, Strnad M (2013) Analysis of gibberellins as free acids by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 112: 85-94.
- Van Gelderen K, Kang C, Paalman R, Keuskamp D, Hayes S, Pierik R (2018) Far-red light detection in the shoot regulates lateral root development through the HY5 transcription factor. *Plant Cell* 30: 101-116.
- Verdeil JL, Alemanno L, Niemenak N, Trambarger TJ (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci* 12: 245-252.
- Vergne P, Dumas C (2000) Genes normally expressed in the endosperm at early stages of microspore embryogenesis in maize. *Plant Mol Biol* 44: 559-574.
- Verma P, Mathur AK (2011) Direct shoot bud organogenesis and plant regeneration from leaf explants in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 106: 401-408.
- Vidal AM, Ben-Cheikh W, Talon M, Garcia-Martinez JL (2003) Regulation of *gibberellin 20-oxidase* gene expression and gibberellin content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid. *Planta* 217: 442-448.
- Vieten A, Sauer M, Brewer PB, Friml J (2007) Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci* 12: 160-168.
- Vineeth TV, Kumar P, Yadav S, Pal M (2015) Optimization of bio-regulators dose based on photosynthetic and yield performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Ind J Plant Physiol* 20: 177-181.
- Vishal B, Kumar PP (2018) Regulation of seed germination and abiotic stresses by gibberellins and abscisic acid. *Front Plant Sci* 9: 838.
- Visser C, Qureshi JA, Gill R, Saxena PK (1992) Morphoregulatory role of TDZ. Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. *Plant Physiol* 99: 1704-1707.
- Vriezen WH, Zhou Z, van der Straeten D (2003) Regulation of submergence-induced shoot elongation in *Oriza sativa* L. *Ann Bot* 91: 263-270.
- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Kyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69: 233-249.
- Vondrakova Z, Dobrev PI, Pesek B, Fischerova L, Vagner M, Motyka V (2018) Profiles of endogenous phytohormones over the course of *Norway spruce* somatic embryogenesis. *Front Plant Sci* 9: 128.
- Vranová E, Inzé D, Van-Breusegen, F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53: 1227-1236.
- Wabnik K, Robert HS, Smith RS, Friml J (2013) Modeling framework for the establishment of the apical-basal embryonic axis in plants. *Curr Biol* 23: 2513-2518.

- Waidmann S, Sarkel E, Kleine-Vehn J (2020) Same same, but different: growth responses of primary and lateral roots. *J Exp Bot* 71: 2397-2411.
- Wallner ES, López-Salmerón V, Greb T (2016) Strigolactone versus gibberellin signaling: reemerging concepts? *Planta* 243: 1339-1350.
- Wang H, Caruso LV, Downie AB, Perry SE (2004) The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *Plant Cell* 16: 1206-1219.
- Wang P, Wang G, Ji J (2005) Embryogenesis and regeneration from different of vegetable soybean. *Soybean Sci* 24: 314-316.
- Wang XC, Niu QW, Teng C, Li C, Mu JY, Chua NH, Zuo JR (2009) Overexpression of *PGA37/MYB118* and *MYB115* promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Cell Res* 19: 224-235.
- Wang L, Mu C, Du M, Chen Y, Tian X, Zhang M, Li Z (2014) The effect of mepiquat chloride on elongation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) internode is associated with low concentration of gibberellic acid. *Plant Sci* 225: 15-23.
- Wang X, Cheng Y, You Z, Sha H, Gong S, Liu J, Sun W (2015a) Sensitive electrochemical determination of oxalic acid in spinach samples by a graphene-modified carbon ionic liquid electrode. *Ionics* 21: 877-884.
- Wang GL, Que F, Xu Z-S, Wang F, Xiong AS (2015b) Exogenous gibberellin altered morphology, anatomic and transcriptional regulatory networks of hormones in carrot root and shoot. *BMC Plant Biol* 15: 290.
- Wang P, Zhang H, Hou H, Wang Q, Li Y, Huang Y, Xie L, Gao F, He S, Li L (2016) Cell cycle arrest induced by inhibitors of epigenetic modifications in maize (*Zea mays*) seedling leaves: characterization of the process and possible mechanisms involved. *New Phytol* 211: 646-657.
- Wang W, Chen Q, Botella JR, Guo SY (2019a) Beyond light: insights into the role of constitutively photomorphogenic1 in plant hormonal signaling. *Front Plant Sci* 10: 557.
- Wang HM, Enns JL, Nelson KL, Brost JM, Orr TD, Ferrie AMR (2019b) Improving the efficiency of wheat microspore culture methodology: evaluation of pretreatments, gradients, and epigenetic chemicals. *Plant Cell Tiss Org Cult* 139: 589-599.
- Wang FX, Shang GD, Wu LY, Xu ZG, Zhao XY, Wang JW (2020a) Chromatin accessibility dynamics and a hierarchical transcriptional regulatory network structure for plant somatic embryogenesis. *Dev Cell* 54: 742-757.
- Wang L, Yin Y, Wang LF, Wang M, Zhao M, Tian Y, Li YF (2020b) Transcriptome profiling of the elongating internode of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings in response to mepiquat chloride. *Front Plant Sci* 10: 1751.
- Weiss D, Ori N (2007) Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones. *Am Soc Plant Biol* 144: 1240-1246.
- Weller JL, Hecht V, van der Schoor JK, Davidson SE, Ross JJ (2009) Light regulation of gibberellin biosynthesis in pea is mediated through the COP1/HY5 pathway. *Plant Cell* 21: 800-813.
- Wen Y, Su SC, Ma LY, Wang XN (2018) Effects of gibberellic acid on photosynthesis and endogenous hormones of *Camellia oleifera* Abel. in 1st and 6th leaves. *J For Res* 23: 309-317.

- Werbrouck SPO, Debergh PC (1996) Imidazole fungicides and paclobutrazol enhance cytokinin-induced adventitious shoot proliferation in *Araceae*. *J Plant Growth Regul* 15: 81-85.
- Weston DE, Reid JB, Ross JJ (2009) Auxin regulation of gibberellin biosynthesis in the roots of pea (*Pisum sativum*). *Funct Plant Biol* 36: 362-369.
- White PR (1943) A handbook of plant tissue culture. 1st edn. Jacques Cottell Press, Lancaster, Pennsylvania, USA.
- Wiesen LB, Bender RL, Paradis T, Larson A, Perera MA, Nikolau BJ, Olszewski NE, Carter CJ (2015) A role for GIBBERELLIN 2-OXIDASE6 and gibberellins in regulating nectar production. *Mol Plant* 9: 753-756.
- Williams EG, Maheshwaran G (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinate behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 57: 443-462.
- Willemsen V, Scheres B (2004) Mechanisms of pattern formation in plant embryogenesis. *Annu Rev Genet* 38: 587-614.
- Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EM, Maier A, Schwechheimer C (2007) The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 1209-1220.
- Willige BC, Isono E, Richter R, Zourelidou M, Schwechheimer C (2011) Gibberellin regulates PIN-FORMED abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23: 2184-2195.
- Wójcik AM, Gaj MD (2016) miR393 contributes to the embryogenic transition induced *in vitro* in *Arabidopsis* via the modification of the tissue sensitivity to auxin treatment. *Planta* 244: 231-243.
- Wójcik AM, Wójcikowska B, Gaj MD (2020) Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. *Int J Mol Sci* 21: E1333.
- Wójcikowska B, Jaskóła K, Gasiorek P, Meus M, Nowak K, Gaj MD (2013) LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) promotes embryogenic induction in somatic tissues of *Arabidopsis*, via YUCCA-mediated auxin biosynthesis. *Planta* 238: 425-440.
- Wójcikowska B, Gaj MD (2015) LEAFY COTYLEDON2-mediated control of the endogenous hormone content: implications for the induction of somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 121: 255-258.
- Wójcikowska B, Gaj MD (2017) Expression profiling of AUXIN RESPONSE FACTOR genes during somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 36: 843-858.
- Wójcikowska B, Botor M, Morończyk J, Wójcik AM, Nodzyński T, Karcz J, Gaj MD (2018) Trichostatin A triggers an embryogenic transition in *Arabidopsis* explants via an auxin-related pathway. *Front Plant Sci* 9: 1353.
- Wójcikowska B, Wójcik AM, Gaj MD (2020) Epigenetic regulation of auxin-induced somatic embryogenesis in plants. *Int J Mol Sci* 21: 2307.
- Wolbang CM, Ross JJ (2001) Auxin promotes gibberellin biosynthesis in decapitated tobacco plants. *Planta* 214: 153-157.

- Wolbang CM, Chandler PM, Smith JJ, Ross JJ (2004) Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellins in barley stems. *Plant Physiol* 134: 769-776.
- Wu Y, Haberland G, Zhou C, Koop HU (1992) Somatic embryogenesis, formation of morphogenic callus and normal development in zygotic embryos of *Arabidopsis thaliana* *in vitro*. *Protoplasma* 169: 89-96.
- Wu K, Li L, Gage D, Zeevaart JAD (1996) Molecular cloning and photoperiod-regulated expression of *gibberellin 20-oxidase* from the long day plant spinach. *Plant Physiol* 110: 547-554.
- Xiao XG, Branchard M (1993) Embryogenesis and plant regeneration of spinach (*Spinacia oleracea* L.) from hypocotyl segments. *Plant Cell Rep* 13: 69-71.
- Xiao XG, Branchard M (1995) *In vitro* high frequency plant regeneration from hypocotyl and root segments of spinach by organogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 42: 239-244.
- Xiao W, Custard RD, Brown RC, Lemmon BE, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL (2006) DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell* 18: 805-814.
- Xie D, Hong Y (2001) Regeneration of *Acacia mangium* through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 20: 34-40.
- Xu Y, Li L, Wu K, Peeters AJ, Gage DA, Zeevaart JA (1995) The GA5 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Plant Biol* 92: 6640-6644.
- Xu Z, Zhang C, Zhang X, Liu C, Wu Z, Yang Z, Zhou K, Yang X, Li F (2013) Transcriptome profiling reveals auxin and cytokinin regulating somatic embryogenesis in different sister lines of cotton cultivar CCRI24. *J Integr Plant Biol* 55: 631-642.
- Xu Z, Zhang C, Ge X, Wang N, Zhou K, Yang X, Qian Y, Li F (2015a) Construction of a high-density linkage map and mapping quantitative trait loci for somatic embryogenesis using leaf petioles as explants in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep* 34: 1177-1187.
- Xu C, Jiao C, Zheng Y, Sun H, Liu W, Cai X, Wang X, Liu S, Xu Y, Mou B, Dai S, Fei Z, Wang Q (2015b) *De novo* and comparative transcriptome analysis of cultivated and wild spinach. *Sci Rep* 5: 17706.
- Xu PB, Lian HL, Wang WX, Xu F, Yang HQ (2016) Pivotal roles of the phytochrome-interacting factors in cryptochrome signaling. *Mol Plant* 9: 496-497.
- Xu C, Jiao C, Sun H, Cai X, Wang X, Ge C, Zheng Y, Liu W, Sun X, Xu Y, Deng J, Zhang Z, Huang S, Dai S, Mou B, Wang Q, Fei Z, Wang Q (2017) Draft genome of spinach and transcriptome diversity of 120 *Spinacia* accessions. *Nat Commun* 8: 15275.
- Xu F, He S, Zhang J, Mao Z, Wang W, Li T, Hua J, Du S, Xu P, Li L, Lian H2, Yang HQ (2018) Photoactivated CRY1 and phyB interact directly with AUX/IAA proteins to inhibit auxin signaling in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 11: 523-541.
- Xu J, Yang X, Li B, Chen L, Min L, Zhang X (2019a) GhL1L1 affects cell fate specification by regulating GhPIN1-mediated auxin distribution. *Plant Biotechnol J* 17: 63-74.
- Xu K, Chang Y, Wang W, Zhang J, Feng B, Wang C, Liu Y, Chen Q, Tan G, Li C, Zhao L (2019b) Overexpression of RcLEC1-B, a HAP3 transcription factor of PLB from *Rosa canina*,

- increases the level of endogenous gibberellin and alters the development of cuticle and floral organs in *Arabidopsis*. *Gene* 688: 119-131.
- Xu K, Wang W, Yu D, Li X, Chen J, Feng B, Zhao Y, Cheng M, Liu X, & Li C (2019c) NAA at a high concentration promotes efficient plant regeneration via direct somatic embryogenesis and SE-mediated transformation system in *Ranunculus sceleratus*. *Sci Rep* 9: 18321.
- Xu YY, Yang M, Cheng F, Liu SA, Liang YY (2020) Effects of LED photoperiods and light qualities on *in vitro* growth and chlorophyll fluorescence of *Cunninghamia lanceolata*. *Bmc Plant Biol* 20: 269.
- Yabuta T (1935) Biochemistry of the 'bakanae' fungus of rice. *Agric Hort* 10: 17-22.
- Yamamuro C, Zhu JK, Yang Z (2016) Epigenetic modifications and plant hormone action. *Mol Plant* 9: 57-70.
- Yamaguchi S, Smith MW, Brown RSG, Kamiya Y, Sun T (1998) Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 β hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seed. *Plant Cell* 10: 2115-2126.
- Yamaguchi S, Kamiya Y (2000) Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol* 3: 251-257.
- Yamaguchi S, Kamiya Y, Sun T (2001) Distinct cell specific expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during *Arabidopsis* seed germination. *Plant J* 28: 443-453.
- Yamauchi Y, Ogawa M, Kuwahara A, Hanada A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2004) Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* 16: 367-378.
- Yamauchi Y, Takeda-Kamiya N, Hanada A, Ogawa M, Kuwahara A, Seo M, Kamiya Y, Yamaguchi S (2007) Contribution of gibberellin deactivation by *AtGA2ox2* to the suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiol* 48: 555-561.
- Yamaguchi S (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59: 225-251.
- Yan W, Zhang XX, Yuan A (2011) Effects of two plant growth regulators on the growth and recovery of alfalfa seedlings exposed to aluminum stress. *J Shanghai Jiaotong Univ Agric Sci* 29: 75-82.
- Yanai O, Shani E, Dolezal K, Tarkowski P, Sablowski R, Sandberg G, Samach A, Ori N (2005) *Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol* 15: 1566-1571.
- Yang AF, Zhu YM, Hou AJ (2003) Several factors affecting somatic embryos derived from cotyledons of cucumber (*Cucumis sativus*). *Plant Physiol Commun* 3: 206-208.
- Yang JL, Seong ES, Kim MJ, Ghimire BK, Kang WH, Yu CY, Li CH (2010) Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 100: 49-58.
- 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 Biol* 12: 110.
- Yang C, Ma Y, Li J (2016) The rice *YABBY4* gene regulates plant growth and development through modulating the gibberellin pathway. *J Exp Bot* 67: 5545-5556.
- Yang C, Lin L (2017) Hormonal regulation in shade avoidance. *Front Plant Sci*: 8: 1-8.

- Yang X, Yang Xi, Guo T, Gao K, Zhao T, Chen Z, An X (2018a) High-efficiency somatic embryogenesis from seedlings of *Koelreuteria paniculata* Laxm. *Forests* 9: 769.
- Yang F, Fan Y, Wu X, Cheng Y, Liu Q, Feng L, Chen J, Wang Z, Wang X, Yong T (2018b) Auxin-to-gibberellin ratio as a signal for light intensity and quality in regulating soybean growth and matter partitioning. *Fron Plant Sci* 9: 56.
- Yang L, Wei C, Huang C, Liu HN, Zhang D, Shen H, Li Y (2019) Role of hydrogen peroxide in stress-induced programmed cell death during somatic embryogenesis in *Fraxinus mandshurica*. *J For Res* 30: 767-777.
- Yarbough JA (1932) Anatomical and developmental studies of the foliar embryos of *Bryophyllum calcinum*. *Am J Bot* 19: 443-453.
- Yaxley JR, Ross JJ, Sherriff LJ, Reid JB (2001) Gibberellin biosynthesis mutations and root development in pea. *Plant Physiol* 125: 627-633.
- Yumbla-Orbes M, Ferreira da Cruz AC, Marques Pinheiro MV, Rocha DI, Batista DS, Koehler AD, Barbosa JG, Otoni WC (2017) Somatic embryogenesis and *de novo* shoot organogenesis can be alternatively induced by reactivating pericycle cells in *Lisianthus (Eustoma grandifolium (Raf.) Shinnery)* root explants. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 53: 209-218.
- Zanewich KP, Rood SB (1993) Distribution of endogenous gibberellins in vegetative and reproductive organs of *Brassica*. *J Plant Growth Regul* 12: 41-46.
- Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress related plant reactions. *Electron J Biotechnol* 13: 4.
- Zeng F, Zhang X, Cheng L, Hu L, Zhu L, Cao J, Guo X (2007) A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics* 90: 620-628.
- Zdravković-Korać S, Nešković M (1993) Somatic embryogenesis in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Arch Biol Sci* 45: 57-58.
- Zdravković-Korać S, Nešković M (1998) Organogenesis and somatic embryogenesis in *Spinacia oleracea* tissue culture. *Arch Biol Sci* 50: 183-188.
- Zdravković-Korać S, Nešković M (1999) Induction and development of somatic embryos from spinach (*Spinacia oleracea*) leaf segments. *Plant Cell Tiss Org Cult* 55: 109-114.
- Zdravković-Korać S, Tubić Lj, Devrnja N, Čalić D, Milojević J, Milić M, Savić J (2019) Somatic embryogenesis from stamen filaments of *Aesculus flava* Sol. and peroxidase activity during the transition from friable to embryogenic callus. *Sci Hortic* 247: 362-372.
- Zeevaart JAD, Gage DA, Talon M (1993) Gibberellin A₁ is required for stem elongation in spinach. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7401-7405.
- Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, Sun TP (2007) Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 3037-3057.
- Zhang HX, Zeevaart JAD (1999) An efficient *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation and regeneration system for cotyledons of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Cell Rep* 18: 640-645.

- Zhang BH, Feng R, Liu F, Wang Q (2001) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. *Bot Bull Acad Sin* 42: 9-16.
- Zhang Y, Zhu Y, Peng Y, Yan D, Li Q, Wang J, Wang L, He Z (2008) Gibberellin homeostasis and plant height control by EUI and a role for gibberellin in root gravity responses in rice. *Cell Res* 18: 412-421.
- Zhang J, Zhang S, Han S, Wu T, Li X, Li W, Qi L (2012a) Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. *Planta* 236: 647-657.
- Zhang R, Wang Y, Liu G, Wang Y, Li J, Wang X, Yang C (2012b) Investigation of temporal variations in endogenous gibberellin A3 and A4 in the leaves of birch (*Betula platyphylla*). *Trees* 26: 1113-1121.
- Zhang Y, Clemens A, Maximova SN, Guiltinan MJ (2014a) The *Theobroma cacao* B3 domain transcription factor TcLEC2 plays a dual role in control of embryo development and maturation. *BMC Plant Biol* 14: 106.
- Zhang D, Jing Y, Jiang Z, Lin R (2014b) The chromatin remodeling factor PICKLE integrates brassinosteroid and gibberellin signaling during skotomorphogenic growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26: 2472-2485.
- Zhang D, Ren L, Yue JH, Shi YB, Zhuo LH, Wang L, Shen XH (2015) RNASeq-based transcriptome analysis of stem development and dwarfing regulation in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton. *Gene* 565: 252-267.
- Zhang S, Zhang D, Fan S, Du L, Shen Y, Xing L, Li Y, Ma J, Han M (2016) Effect of exogenous GA₃ and its inhibitor paclobutrazol on floral formation, endogenous hormones, and flowering-associated genes in 'Fuji' apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Physiol Biochem* 107: 178-186.
- Zhang J, Xue B, Gai M, Song S, Jia N, Sun H (2017a) Small RNA and transcriptome sequencing reveal a potential miRNA-mediated interaction network that functions during somatic embryogenesis in *Lilium pumilum* DC. Fisch. *Front Plant Sci* 8: 566.
- Zhang T, Q, Lian H, Zhou CM, Xu L, Jiao Y, Wang JW (2017b) A two-step model for *de novo* activation of WUSCHEL during plant shoot regeneration. *Plant Cell* 29: 1073-1087.
- Zhang H, Zhang TT, Liu H, Shi DY, Wang M, Bie XM, Li XG, Zhang XS (2018) Thioredoxin-mediated ROS homeostasis explains natural variation in plant regeneration. *Plant Physiol* 176: 2231-2250.
- Zhao XYX, Foo E, Symons GM, Lopez J, Bendehakkalu T, Xiang J, Weller JL, Liu X, Reid JB, Lin C (2007) A study of gibberellin homeostasis and cryptochrome-mediated blue light inhibition of hypocotyl elongation. *Plant Physiol* 145: 106-118.
- Zhao XY, Su YX, Zhang CL, Wang L, Li XG, Zhang XS (2013) Differences in capacities of *in vitro* organ regeneration between two *Arabidopsis* ecotypes Wassilewskija and Columbia. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 112: 65-74.
- Zheng Y, Ren N, Wang H, Stromberg AJ, Perry SE (2009) Global identification of targets of the *Arabidopsis* MADS domain protein AGAMOUS Like15. *Plant Cell* 21: 2563-2577.

- Zheng Q, Zheng Y, Perry SE (2013) AGAMOUS-Like15 promotes somatic embryogenesis in *Arabidopsis* and soybean in part by the control of ethylene biosynthesis and response. *Plant Physiol* 161: 2113-2127.
- Zheng W, Zhang X, Yang Z, Wu J, Li F, Duan L, Liu C, Lu L, Zhang C Li F (2014) At Wuschel promotes formation of the embryogenic callus in *Gossypium hirsutum*. *PLoS ONE* 9: e87502.
- Zheng Q, Perry SE (2014) Alterations in the transcriptome of soybean in response to enhanced somatic embryogenesis promoted by orthologs of Agamous-like15 and Agamous-like18. *Plant Physiol* 164: 1365-1377.
- Zheng Q, Zheng Y, Ji H, Burnie W, Perry SE (2016) Gene regulation by the AGL15 transcription factor reveals hormone interactions in somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 172: 2374-2387.
- Zhou W, Xi H (1993) Effects of mixtalol and paclobutrazol on photosynthesis and yield of rape (*Brassica napus*). *J Plant Growth Regul* 12: 157-161.
- Zhou Y, Tan B, Luo M, Li Y, Liu C, Chen C, Yu CW, Yang S, Dong S, Ruan J, Yuan L, Zhang Z, Zhao L, Li C, Chen H, Cui Y, Wu K, Huang S (2013) HISTONE DEACETYLASE19 interacts with HSL1 and participates in the repression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 25: 134-148.
- Zhou T, Yang X, Guo K, Deng J, Xu J, Gao W, Lindsey K, Zhang X (2016) ROS homeostasis regulates somatic embryogenesis via the regulation of auxin signaling in cotton. *Mol Cell Proteomics* 15: 2108-2124.
- Zhou X, Zheng R, Liu G, Xu Y, Zhou Y, Laux T, Zhen Y, Harding SA, Shi J, Chen J (2017) Desiccation treatment and endogenous IAA levels are key factors influencing high frequency somatic embryogenesis in *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. *Front Plant Sci* 8: 2054.
- Zhu LH, van de Peppel A, Li XY, Welander M (2004) Changes of leaf water potential and endogenous cytokinins in young apple trees treated with or without paclobutrazol under drought conditions. *Sci Hortic* 99: 133-141.
- Zhu Y, Nomura T, Xu Y, Zhang Y, Peng Y, Mao B, Hanada A, Zhou H, Wang R, Li P, Zhu X, Mander LN, Kamiya Y, Yamaguchi S, He Z (2006) *ELONGATED UPPERMOST INTERNODE* encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* 18: 442-456.
- Zhu Y (2010) The epigenetic involvement in plant hormone signaling. *Chin Sci Bull* 55: 2198-2203.
- Zimmerman JL (1993) Somatic embryogenesis. *Plant Cell* 5: 1411-1423.
- Zuo J, Niu QW, Frugis G, Chua NH (2002) The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J* 30: 349-359.

BIOGRAFIJA AUTORA

Maja Belić, rođena Milić, je rođena 09.05.1991. god. u Beogradu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne akademske studije je upisala školske 2010/2011. god. na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu na smeru Biologija. Diplomirala je 2014. god. sa prosečnom ocenom 9.09. Iste godine je upisala master studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na smeru Fiziologija biljaka. Master akademske studije je završila 2015. god. sa prosečnom ocenom 10.00 i iste godine je upisala doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Biologija, modulu Fiziologija i molekularna biologija biljaka. U periodu od 2017-2018 godine je bila stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Izabrana je na konkursu za talentovane mlade istraživače za učešće na naučno istraživačkim projektima, koju je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja objavilo 28.3.2018. godine. Zaposlena je na Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković" od 1. juna 2018. godine. U februaru 2021. godine je izabrana u zvanje istraživač-saradnik.

Maja Belić je u periodu 2014–2019. godine učestvovala u realizaciji projekta „Biotehnologija *in vitro* – gajene, lekovite i ugrožene biljne vrste” (evidencioni br. 173015), iz oblasti osnovnih istraživanja, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, realizovanog pod rukovodstvom dr Branke Vinterhalter. U dosadašnjoj karijeri je publikovala 4 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima, 1 u istaknutom međunarodnom časopisu i 8 saopštenja na međunarodnim skupovima. Dobitnik je nagrade za najbolji poster na simpozijumu "Gibberellins 2019–Current Progress in Gibberellin Research", organizovanog od strane uglednog Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Institute of Experimental Botany, Czech Academy of Sciences 2019. god. Maja Belić je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije i Federacije evropskih udruženja za biljnu biologiju (The Federation of European Societies of Plant Biology - FESPB).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Маја М. Белић _____

број индекса _____ Б3001/2015 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Синергистички утицај гибберелина и светлости на индукцију соматске
ембриогенезе из латералних коренова спанаћа (*Spinacia oleracea* L.) *in vitro*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Маја М. Белић _____

Број индекса _____ Б3001/2015 _____

Студијски програм _____ Физиологија и молекуларна биологија биљака _____

Наслов рада _____ Синергистички утицај гибберелина и светлости на индукцију соматске
ембриогенезе из латералних коренова спанаћа (*Spinacia oleracea* L.) *in vitro* _____

Ментор _____ др Јелена Милојевић _____

Потписани/а _____ Маја М. Белић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Синергистички утицај гиберелина и светлости на индукцију соматске ембриогенезе

из латералних коренова спанаћа (*Spinacia oleracea* L.) *in vitro*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____
