

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Biljana K. Filipović

**ULOGA ARABINOGALAKTANSKIH  
PROTEINA U PROCESU  
MORFOGENEZE *IN VITRO* KOD KIČICE  
(*Centaurium erythraea* Rafn.)**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Biljana K. Filipović

**THE ROLE OF ARABINOGALACTAN  
PROTEINS IN CENTAURY  
(*Centaurium erythraea* Rafn.)  
MORPHOGENESIS  
*IN VITRO***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

---

Dr Angelina Subotić, naučni savetnik IBISS-a Univerziteta u Beogradu, mentor

---

Dr Ivana Dragičević, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu,  
mentor

---

Dr Ana Simonović, viši naučni saradnik IBISS-a Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja »Siniša Stanković« Univerziteta u Beogradu.*

*Izuzetnu zahvalnost dugujem svom mentoru dr Angelini Subotić na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da učestvujem u ovim interesantnim istraživanjima. Zahvalna sam na stručnoj pomoći i idejama tokom planiranja eksperimenata, kao i na pomoći u predstavljanju rezultata, na uloženom trudu, prenesenom znanju i optimizmu.*

*Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr Ivani Dragičević koja je bila spremna da nesebično podeli svoje znanje i iskustvo, i da savetima i korisnim sugestijama značajno doprinese uobličavanju teksta ove disertacije. Zahvalna sam na stručnoj pomoći i predusretljivosti.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Ani Simonović, na pomoći, prenešenom znanju, upoznavanju sa tehnikama molekularne biologije i idejama čijim je ostvarivanjem omogućeno postizanje zapaženih rezultata iz oblasti molekularne biologije u ovoj doktorskoj disertaciji. Takođe se zahvaljujem na pomoći u tumačenju i predstavljanju rezultata koja je bila dragocena.*

*Deo istraživanja ove disertacije koji se tiče sekvenciranja gena urađen je u Odeljenju za neurobiologiju Instituta za biološka istraživanja »Siniša Stanković« Univerziteta u Beogradu i ovom prilikom želim da se zahvalim dr Vedrani Milinković.*

*Zahvaljujem se Dr Saši Malkovu, za doprinos u analizi sekvenciranog transkriptoma kičice, što je omogućilo istraživanja predstavljena u ovoj disertaciji.*

*Mojoj dragoj kolegini dr Milani Trifunović se zahvaljujem na pomoći u eksperimentalnom radu koji se odnosi na analizu arabinogalaktanskih proteina i na pomoći prilikom predstavljanja rezultata. Posebno želim da joj se zahvalim za svu podršku, a naročito onda kada je bilo najteže.*

*Dr Slađani Jevremović se zahvaljujem na sintetičkom Yariv reagensu.*

*Mojim dragim kolegicama dr Jeleni Savić i dr Slavici Dmitrović se zahvaljujem na pomoći u eksperimentalnom radu koji se odnosi na oblast antioksidativnih enzima. Dr Jeleni Savić se neizmerno zahvaljujem na velikoj ljubaznosti i pomoći koja je dolazila u pravom trenutku. Dr Milanu Dragičeviću se zahvaljujem na korisnim savetima u eksperimentalnom radu.*

*Želim da se zahvalim mojim kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja »Siniša Stanković« u Beogradu koji su na bilo koji način pomogli u izradi ove disertacije.*

*Mojoj divnoj porodici veliko hvala...*

*Za Katarinu i Sofiju...*



# **Uloga arabinogalaktanskih proteina u procesu morfogeneze *in vitro* kod kičice (*Centaurium erythraea* Rafn.)**

## **REZIME**

Kičica (*Centaurium erythraea* Rafn.) je biljna vrsta širokog spektra lekovitih dejstava, koja se odlikuje visokom regenerativnom sposobnošću u uslovima *in vitro* kulture. Osnovni cilj disertacije bio je izučavanje pojedinih biohemijskih i molekularnih aspekata *in vitro* morfogeneze kičice sa svrhom rasvetljavanja osnova razvojne plastičnosti ove biljne vrste koja se ispoljava u uslovima *in vitro* kulture. U ovom istraživanju je *in vitro* morfogenezna kičice indukovana iz odsečaka listova na svetlosti i u mraku. Na hranljivoj podlozi bez regulatora rasteња i na svetlosti odvijao se proces direktne organogeneze pupoljaka, a u mraku proces direktne rizogeneze. Regeneracija biljaka putem indirektno somatske embriogeneze (SE) je postignuta na hranljivim podlogama sa regulatorima rasteња 2,4-D i CPPU i na svetlosti i u mraku, dok je na istim podlogama, za regeneraciju pupoljaka indirektnom organogenezom, svetlost bila obligatorni faktor. Anatomska istraživanja su pokazala da je razvoj somatskih embriona bio asinhron, a na svetlosti se odvijao simultano sa razvojem adventivnih pupoljaka. U ovim istraživanjima je uspostavljen model-sistem pogodan za komparativnu analizu *in vitro* morfogogenetskih procesa kod kičice na molekularnom i biohemijskom nivou. Ispitana je ukupna aktivnost antioksidativnih enzima, superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i peroksidaza (POX), kao i zastupljenost i aktivnost pojedinih izoformi ispitivanih enzima tokom različitih morfogogenetskih procesa. Analize su pokazale da su SOD i CAT uključene u antioksidativnu zaštitu listova kičice od oštećenja izazvanih povredom, do koje dolazi prilikom izolovanja eksplantata, dok je totalna aktivnost POX bila snažno indukovana tokom morfogeneze na svim ispitivanim hranljivim podlogama. Uloga arabinogalaktanskih proteina (AGP), proteina ćelijskog zida bogatih hidrosiprolinom, tokom različitih morfogogenetskih procesa *in vitro* kičice istražena je primenom nekoliko pristupa. Dodavanje  $\beta$ -D-glukozil Yariv reagensa ( $\beta$ GlcY), koji specifično vezuje i precipitira AGP i na taj način sprečava AGP da obave svoju funkciju, u hranljive podloge dovelo je do smanjenja broja somatskih embriona i adventivnih pupoljaka po eksplantatu. Uporednom analizom je nađeno da se ispitivani

morfofenetski procesi razlikuju po svojoj osetljivosti na  $\beta$ GlcY, te da se po rastućoj senzitivnosti mogu poređati kao: direktna rizogeneza (neosetljiva) < indirektna organogeneza pupoljaka < direktna organogeneza pupoljaka << indirektna SE (veoma osetljiva). Količina AGP, određena metodom radijalne difuzije, povećavala se tokom indukcije različitih morfofenetskih procesa. Metodom ukrštene elektroforeze je pokazano da su različiti morfofenetski procesi praćeni sintezom različitih setova AGP. Korišćenjem monoklonalnih antitela LM2, JIM4 i JIM13, specifičnih za ugljenohidratne delove AGP molekula, imunohistohemijski su lokalizovani specifićni AGP epitopi u ćelijskom zidu i pokazana njihova razvojna regulacija tokom SE. Polazeći od sekvenciranog i rekonstruisanog transkriptoma korena i lista kićice, identifikovana su četiri *AGP* transkripta, oznaćena kao *CeAGP1 – 4*. Sekvence ovih transkripata su potvrđene direktnim sekvenciranjem, dok je bioinformatićkom analizom pokazano da *CeAGP1*, *CeAGP2* i *CeAGP4* kodiraju AGP sa fasciklinskim domenima (FLA), dok je *CeAGP3* AG-peptid sa konzervisanim DUF1070 domenom. Analizom ekspresije ovih gena qRT-PCR metodom je pokazano da se *CeAGP1* specifićno indukuje tokom indirektna SE, dok se *CeAGP3* eksprimira tokom morfogeneze na svim hranljivim podlogama.

U ovom radu je kićica po prvi put predloćena kao odlićan model-organizam u biologiji razvića biljaka, koji je pogodan za proućavanje biohemijskih i molekularnih aspekata *in vitro* morfogeneze. Dobijeni podaci o ulozi antioksidativnih enzima i AGP proteina tokom morfogeneze kićice *in vitro* predstavljaju prve rezultate istraćivanja morfogeneze na biohemijskom i molekularnom nivou kod ove vrste.

**Kljućne reći:** *Centaurium erythraea* Rafn., kultura *in vitro*, organogeneza, somatska embriogeneza, antioksidativni enzimi, arabinogalaktanski proteini,  $\beta$ -D-glukozil Yariv reagens, imunohistohemija, FLA, DUF1070.

**Naućna oblast:** Biologija

**Uća naućna oblast:** Fiziologija biljaka

**UDK broj:** 577.21:581.1:582.923.1(043.3)

**The role of arabinogalactan proteins in centaury  
(*Centaurium erythraea* Rafn.) morphogenesis *in vitro***

**ABSTRACT**

Common centaury (*Centaurium erythraea* Rafn.) is a plant species with a broad spectrum of medicinal effects, characterized with high regenerative potential under conditions of *in vitro* culture. The main objective of the current dissertation was the study of some biochemical and molecular aspects of *in vitro* morphogenesis of centaury, with an aim to elucidate the basis of its developmental plasticity that is manifested in *in vitro* culture. In the current study the *in vitro* morphogenesis was induced on light and in darkness. Direct shoot organogenesis was induced on growth regulator-free culture media on light, whereas on the same media in darkness, direct rhizogenesis occurred. Plant regeneration *via* indirect somatic embryogenesis (SE) was accomplished on growth media with growth regulators 2,4-D and CPPU on both light regimes, while for shoot regeneration by indirect organogenesis, light was an obligatory factor. Anatomical studies revealed that the development of somatic embryos was asynchronous and proceeded simultaneously with the development of adventitious buds on light. Thus, this work established a model-system for comparative analysis of *in vitro* morphogenetic processes in centaury on molecular and biochemical level. Total activities of antioxidative enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POX), as well as the presence and activities of their isoforms during different morphogenetic processes, were also determined. It was shown that SOD and CAT were involved in antioxidative protection of centaury leaves wounded during explant isolation, whereas total POX activity was strongly induced during morphogenesis on all growth media. The role of arabinogalactan proteins (AGPs), plant cell-wall hydroxyproline-rich proteins, during different morphogenetic processes *in vitro* was investigated using several approaches. The addition of  $\beta$ -D- glucosyl Yariv reagent ( $\beta$ GlcY) that specifically binds to, precipitates and thus inactivates AGPs, to the culture media, caused a reduction of the number of somatic embryos and adventitious buds formed per explant. Comparative analysis revealed that the investigated

morphogenetic processes differ in sensitivity to  $\beta$ GlcY, so that they can be arranged in order of increasing sensitivity to  $\beta$ GlcY as: direct rhizogenesis (insensitive) < indirect shoot organogenesis < direct shoot organogenesis << indirect SE (very sensitive). The AGP content, as determined by radial diffusion method, increased during induction of different morphogenetic processes. Using crossed electrophoresis method it was shown that different morphogenetic processes are accompanied by synthesis of different AGP sets. Using monoclonal antibodies LM2, JIM4 and JIM13, specific for carbohydrate moieties of AGP molecules, the specific AGP epitopes were immunohistochemically localized to the cell wall and their developmental regulation during SE was demonstrated. Starting from sequenced and assembled leaf and root centaury transcriptome, four AGP genes were identified and named *CeAGP1* through *4*. The transcript sequences were verified by direct sequencing, and the bioinformatics analysis revealed that *CeAGP1*, *CeAGP2* and *CeAGP4* encode AGPs with fasciclin (FAS) domain, whereas *CeAGP3* is an AG peptide with a conserved DUF1070 domain. The expression analysis of these genes by qRT-PCR amplification showed that *CeAGP1* is specifically induced during indirect SE, while *CeAGP3* is expressed during morphogenesis on all growth media.

In the current work, centaury is for the first time proposed as an excellent model organism in developmental plant biology, suitable for study of biochemical and molecular aspects of *in vitro* morphogenesis. The data obtained on the role of antioxidative enzymes and AGPs during *in vitro* morphogenesis in centaury represent the first study of morphogenesis in this species on biochemical and molecular level.

**Key words:** *Centaureum erythraea* Rafn., *in vitro* culture, organogenesis, somatic embryogenesis, antioxidative enzymes, arabinogalactan proteins,  $\beta$ -D- glucosyl Yariv ( $\beta$ GlcY) reagent, immunohistochemistry, FLA, DUF1070.

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Plant physiology

**UDC number:** 577.21:581.1:582.923.1(043.3)

# SADRŽAJ

strana

## SKRAĆENICE

1.	<b>UVOD</b>	1
1.1	Morfogeneza biljaka u uslovima <i>in vitro</i>	1
1.1.1.	Somatska embriogeneza i organogeneza u uslovima <i>in vitro</i>	2
1.1.2.	Uloga regulatora rastenja u SE i organogenezi	5
1.1.3.	Uloga svetlosti u SE i organogenezi	7
1.2.	Biohemijski i molekularni aspekti SE	7
1.3.	Arabinogalaktanski proteini	9
1.3.1.	Struktura i podela AGP	10
1.3.2.	Pregled metoda za detekciju, lokalizaciju i proučavanje AGP	17
1.3.3.	Biološke uloge AGP	21
1.3.4.	Biološke uloge FLA	23
1.4.	Oksidativni stres kod biljaka	24
1.4.1.	Antioksidativni enzimi biljaka	27
1.4.1.1.	Superoksid dismutaze	27
1.4.1.2.	Katalaze	28
1.4.1.3.	Peroksidaze	28
1.4.2.	Oksidativni stres kod biljaka tokom morfogeneze <i>in vitro</i>	29
1.5.	Opšte karakteristike kičice ( <i>Centaureum erythraea</i> Rafn.)	31
1.5.1.	Regeneracija kičice <i>in vitro</i>	33
2.	<b>CILJ RADA</b>	36
3.	<b>MATERIJAL I METODE</b>	37
3.1.	Biljni materijal	37
3.2.	Uspostavljanje <i>in vitro</i> kulture klijanaca <i>C. erythraea</i> Rafn.	37
3.3.	Hranljive podloge	37
3.3.1.	Hranljive podloge za ispitivanje morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	38
3.3.2.	Hranljive podloge za ispitivanje efekata $\beta$ GlcY na proces morfogeneze <i>in vitro</i>	38
3.4.	Uslovi gajenja <i>in vitro</i> kultura	39
3.5.	Ispitivanje efekata regulatora rastenja, uslova osvetljenja i $\beta$ GlcY na proces morfogeneze <i>in vitro</i>	40
3.5.1.	Ispitivanje efekata regulatora rastenja i uslova osvetljenja na proces morfogeneze <i>in vitro</i>	40
3.5.2.	Ispitivanje efekata $\beta$ GlcY na proces morfogeneze <i>in vitro</i>	41
3.6.	Anatomska istraživanja morfogeneze <i>in vitro</i>	41
3.6.1.	Fiksacija biljnog materijala i pravljenje trajnih preparata	41
3.7.	Biohemijska istraživanja morfogeneze <i>in vitro</i>	42
3.7.1.	Analiza aktivnosti antioksidativnih enzima tokom indukcije morfogeneze <i>in vitro</i>	42

3.7.1.1.	Izolacija i kvantifikacija ukupnih proteina	43
3.7.1.2.	Nativna elektroforeza ( <i>Native PAGE</i> )	43
3.7.1.3.	Određivanje aktivnosti superoksid dismutaza	44
3.7.1.4.	Određivanje aktivnosti katalaza	45
3.7.1.5.	Određivanje aktivnosti peroksidaza	46
3.7.2.	Analiza arabinogalaktanskih proteina	47
3.7.2.1.	Izolacija arabinogalaktanskih proteina	47
3.7.2.2.	Određivanje koncentracije arabinogalaktanskih proteina radijalnom difuzijom	47
3.7.2.3.	Određivanje kvalitativnih osobina arabinogalaktanskih proteina ukrštenom elektroforezom	48
3.7.2.4.	Imunohistohemijska lokalizacija arabinogalaktanskih proteina	49
3.8.	Sekvenciranje AGP gena i njihova ekspresija tokom morfogeneze	50
3.8.1.	Identifikacija AGP sekvenci kičice	50
3.8.2.	Direktno sekvenciranje identifikovanih potencijalnih AGP gena kičice	51
3.8.2.1.	Izolacija RNK	51
3.8.2.2.	Tretman DNK-azom	52
3.8.2.3.	Reverzna transkripcija	52
3.8.2.4.	PCR amplifikacija	53
3.8.2.5.	Prečišćavanje PCR produkata	55
3.8.2.6.	Direktno sekvenciranje cDNA potencijalnih AGP transkripata	55
3.8.2.7.	Bioinformatička analiza proteinskih sekvenci AGP kičice	57
3.8.3.	RT-PCR i qRT-PCR analiza ekspresije gena koji kodiraju sintezu arabinogalaktanskih proteina kičice	57
3.8.3.1.	PCR amplifikacija	58
3.8.3.2.	Priprema standarda za qRT-PCR reakcije	59
3.8.3.3.	Kvantitativni RT-PCR	60
3.9.	Statistička obrada podataka	61
4.	<b>REZULTATI</b>	62
4.1.	Proces morfogeneze <i>in vitro</i> iz odsečaka listova kičice	62
4.2.	Regeneracija i aklimatizacija biljaka <i>C. erythraea</i>	70
4.3.	Anatomska istraživanja morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	72
4.4.	Aktivnost antioksidativnih enzima tokom morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	76
4.4.1.	Aktivnost superoksid dismutaza tokom morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	76
4.4.2.	Aktivnost katalaza tokom morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	80
4.4.3.	Aktivnost peroksidaza tokom morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	83
4.5.	Ispitivanje uloge AGP u procesu morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	86
4.5.1.	Efekat $\beta$ GlcY na proces morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	86
4.5.2.	Kvantifikacija i lokalizacija AGP tokom morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	91
4.5.2.1.	Koncentracija AGP tokom morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	91
4.5.2.2.	Koncentracija AGP tokom morfogeneze <i>in vitro</i> u prisustvu $\beta$ GlcY	92
4.5.2.3.	Elektroforetski profil AGP tokom morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	95

4.5.2.4.	Imunohistohemijska lokalizacija AGP tokom morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	96
4.5.3.	Sekvenciranje <i>AGP</i> gena i karakterizacija proteinskih sekvenci AGP kičice	98
4.5.4.	Kvantifikacija ekspresije <i>AGP</i> gena tokom morfogeneze <i>in vitro</i>	111
5.	<b>DISKUSIJA</b>	117
5.1.	Morfogeneza iz odsečaka listova kičice <i>in vitro</i>	117
5.2.	Aktivnost antioksidativnih enzima tokom procesa morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	122
5.3.	Uloga AGP u procesima morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	127
5.3.1.	Efekat $\beta$ GlcY na procese morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	128
5.3.2.	Kvantifikacija AGP tokom procesa morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	132
5.3.3.	Kvalitativne osobine arabinogalaktanskih proteina tokom procesa morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	133
5.3.4.	Imunohistohemijska lokalizacija AGP tokom procesa morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	135
5.3.5.	Sekvenciranje <i>AGP</i> gena kičice i karakterizacija proteinskih sekvenci AGP	138
5.3.6.	Kvantifikacija ekspresije <i>AGP</i> gena tokom procesa morfogeneze <i>in vitro</i> kičice	143
6.	<b>ZAKLJUČCI</b>	151
7.	<b>LITERATURA</b>	153

## BIOGRAFIJA AUTORA

Prilog 1 – Izjava o autorstvu

Prilog 2 – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije

Prilog 3 – Izjava o korišćenju

## SKRAĆENICE

AG	arabinogalaktani
AGP	arabinogalaktanski proteini
Ala	alanin
ANOVA	analiza varijanse
APS	amonijum persulfat
APX	askorbat peroksidaza
Asc	askorbat
Asn	asparagin
BA	<i>N</i> <sup>6</sup> -benzilaminopurin
βGalY	β-D-galaktozil Yariv reagens
βGlcY	β-D-glukozil Yariv reagens
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BM	bazalni medijum
BSA	<i>bovine serum albumin</i> – goveđi serum albumin
CAT	katalaza
cDNK	komplementarni lanac DNK
CPPU	<i>N</i> -fenil- <i>N'</i> -(2-hloro-4-piridil)urea
Cys	cistein
DAsc	dehidroaskorbat
2,4-D	2,4-dihlorfenoksisirćetna kiselina
DEPC	dietilpirokarbonat
DHAR	dehidroaskorbat reduktaza
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DSE	direktna somatska embriogeneza
DTT	ditiotreitol
ECM	ekstracelularni matriks
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
eNOD-AGP	AGP nalik ranom nodulinu
EXT	ekstenzini
FAS	domen nalik fasciklinu
FLA	arabinogalaktanski proteini nalik fasciklinu
FeEDTA	gvožđe etilendiamintetrasirćetna kiselina
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
Gly	glicin
GPI	glikozilfosfatidil inozitol
GSH	redukovani glutation
GSSG	oksidovani glutation
GR	glutation reduktaza
GPX	glutation peroksidaza
HGRP	proteini bogati hidroksiprolinom
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodonik-peroksid
Hyp	hidroksiprolin
IAA	indol-3-sirćetna kiselina
IBA	indol-3-buterna kiselina
ISE	indirektna somatska embriogeneza



KCN	kalijum cijanid
KIN	kinetin
LS	Linsmaier & Skoog hranljiva podloga
LSD	<i>least significant difference</i> – najmanja statistički značajna razlika
Mabs	monoklonalna antitela
MDAsc	monodehidroaskorbat
MDHAR	monodehidroaskorbat reduktaza
MS	Murashige & Skoog hranljiva podloga
NAA	$\alpha$ -naftalen-sirćetna kiselina
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza
NBT	nitrotetrazolijum hlorigid
nsLTP-AGP	AGP nalik proteinima za transfer nespecifičnih lipida
O <sub>2</sub>	molekularni kiseonik (triplet)
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	singlet kiseonik
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	superoksid radikal
OH <sup>•</sup>	hidroksil radikal
OH <sup>-</sup>	hidroksil jon
O <sub>2</sub> H <sup>•</sup>	perhidroksil radikal
O <sub>3</sub>	ozon
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> -elektroforeza na poliakrilamidnom gelu
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – lančana reakcija polimeraze
PLA	AGP nalik fitocijaninu
PMSF	fenilmetansulfonil fluorid
POX	peroksidaze
Pro	prolin
PRP	proteini bogati prolinom
PVPP	polivinil polipirrolidon
QRT-PCR	kvantitativni RT-PCR
RNK	ribonukleinska kiselina
ROS	reaktivne kiseonične vrste
RT	<i>Reverse Transcription</i> – reakcija reverzne transkripcije
SE	somatska embriogeneza
Ser	serin
SERK	<i>SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE</i>
SOD	superoksid dismutaza
TDZ	tidiazuron
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletan-1,2-diamin
Thr	treonin
TRIS	tris-hidroksimetil aminometan
Val	valin

# 1. U V O D

## 1.1. Morfogeneza biljaka u uslovima *in vitro*

Biljke su sesilni organizmi koji imaju sposobnost da se delovanju varijabilnih faktora spoljašnje sredine prilagođavaju tako što menjaju svoj program razvića i/ili metabolizma (Feher i sar., 2003). U osnovi ove fenotipske plastičnosti razvića biljaka je sposobnost dediferencijacije i rediferencijacije somatskih ćelija. U ekstremnim uslovima, somatske ćelije biljaka menjaju svoj razvojni put: dediferenciraju se i dele ili umiru (programirana ćelijska smrt) (Feher i sar., 2003). Sposobnost biljaka za vegetativno razmnožavanje podrazumeva pojavu da izolovane ćelije, tkiva i organi mogu da regenerišu ceo organizam pod određenim sredinskim uslovima, a zasniva se upravo na mogućnosti biljnih ćelija da se dediferenciraju i ponovnim ulaskom u ćelijski ciklus aktiviraju ćelijske deobe. Tako se dobija veliki broj novih biljaka, koje pripadaju istoj polnoj generaciji. Kako nema ukrštanja, vegetativno potomstvo je genetički homogeno. Regenerativna sposobnost biljaka ima praktičnu primenu u razmnožavanju biljaka putem reznica, krtola, lukovica, kao i u kulturi *in vitro*, koje spadaju u tehnike koje se koriste u biotehnologiji biljaka. Diferencirane somatske ćelije biljaka gajene u sterilnim i kontrolisanim uslovima *in vitro* ispoljavaju svoju fenotipsku plastičnost i totipotentnost. Ove osobine biljnih ćelija su ključne za razmnožavanje biljaka u kulturi *in vitro*. Totipotentnost predstavlja sposobnost biljnih ćelija da se u različitim induktivnim uslovima *in vitro* dediferenciraju, dele i regenerišu pojedine organe, ali i somatske embrione i kompletnu biljku (Feher, 2015). Jedan od najekstremnijih primera fenotipske plastičnosti u razviću biljaka je sposobnost biljnih ćelija da iniciraju embriogeni razvoj (Feher i sar., 2003).

Morfogenetski procesi koji vode regeneraciji cele biljke u uslovima kulture *in vitro* su somatska embriogeneza (SE), organogeneza, mikropropagacija, androgeneza i ginogeneza. U ovom radu razmatraće se samo dva morfogenetska procesa: SE i organogeneza.

Primenom *in vitro* tehnika omogućeno je umnožavanje i komercijalna proizvodnja lekovitih biljaka koje akumuliraju sekundarne metabolite (Ramachandra i Ravishankar, 2002), kao i njihovo očuvanje jer su često ugrožene u prirodi usled

nekontrolisane eksploatacije (Bhojwani i Dantu, 2013). Osim komercijalnog značaja koji kultura *in vitro* ima u različitim oblastima, poput poljoprivrede, hortikulture i farmaceutske industrije, pokazalo se da su ove tehnike veoma značajne za progres u osnovnim istraživanjima.

### **1.1.1. Somatska embriogeneza i organogeneza u uslovima *in vitro***

Diferencirane somatske ćelije gajene u odgovarajućim uslovima *in vitro*, počinju da se dele i mogu regenerisati cele biljke putem SE ili organogeneze (Somleva i sar., 2000). Proces organogeneze predstavlja obrazovanje pupoljaka i korenova, pri čemu su potrebna dva različita indukciona signala za otpočinjanje ovih procesa, jedan za indukciju pupoljaka, a drugi za indukciju korenova, da bi došlo do regeneracije cele biljke (Phillips, 2004). Pupoljci koji nastaju procesom organogeneze zadržavaju vaskularnu vezu sa tkivom iz koga su nastali tako što prokambijalni elementi koji se obrazuju u osnovi pupoljaka uspostavljaju vezu sa već postojećim vaskularnim elementima u početnom eksplantatu (Bhojwani i Dantu, 2013). Somatska embriogeneza je proces tokom koga od somatskih ćelija, u induktivnim uslovima, nastaju embriogene ćelije koje prolaze morfološke i biohemijske promene koje dovode do formiranja somatskog embriona (Quiroz-Figueroa i sar., 2006). Za razliku od regenerisanih pupoljaka, somatske embrione karakteriše rano uspostavljanje bipolarnosti i odsustvo vaskularne veze sa tkivom od koga su nastali. S obzirom da se prilikom formiranja somatskih embriona istovremeno obrazuju meristemi korena i stabla, za njihovo formiranje potreban je jedan indukcioni signal (Phillips, 2004). Oba procesa, SE i organogeneza, mogu biti direktna, bez kalusne međufaze, ili indirektna, što podrazumeva formiranje neorganizovanog kalusnog tkiva (Phillips, 2004). Vegetativno razmnožavanje putem SE može imati prednosti nad organogenezom u praksi, jer se ovim procesom može dobiti veliki broj regeneranata i somatski embrioni mogu koristiti u produkciji veštačkih semena koja imaju široku primenu u različitim oblastima biotehnologije.

Somatska embriogeneza je prvi put opisana u suspenziji ćelija (Steward i sar., 1958) i u kulturi kalusa kod šargarepe (*Daucus carota*) (Reinert, 1958). Proces SE se može podeliti u dve faze koje su označene kao faza indukcije i faza ekspresije (Jimenez

i sar., 2005). U fazi indukcije somatske ćelije stižu embriogene karakteristike tako što dolazi do kompletne reorganizacije stanja ćelije, uključujući fiziologiju, metabolizam i ekspresiju gena, odnosno dediferencijacije (Feher i sar., 2003), dok se u fazi ekspresije embriogene ćelije razvijaju u somatske embrione. Induktivni uslovi, među kojima su najčešće egzogeno dodati regulatori rastanja i stresni faktori, dovode do dediferencijacije biljnih ćelija i aktiviranja embriogenog puta njihovog razvića (Feher, 2015). Iako je SE intenzivno proučavana, još uvek nije poznato zašto i kako se diferencirane ćelije biljaka mogu dovesti u stanje totipotencije i sticanja embriogenog potencijala i zašto se ovaj fenomen događa samo kod određenih biljnih vrsta, pojedinih tipova tkiva ili ćelija (Feher, 2015).

U svom razviću somatski embrioni, kao i zigotski embrioni, prolaze kroz morfološke promene tokom kojih se uočavaju karakteristični stadijumi. U razviću zigotskih i somatskih embriona dikotila postoji nekoliko razvojnih stadijuma: globularni, srcasti, torpedo i kotiledonarni. Embriogene ćelije nakon formiranja nastavljaju da se dele i diferenciraju se u globularni somatski embrion. Prvo organizovano tkivo u ovom stadijumu razvića je protoderm, koje omogućava dalji razvoj embriona do srcastog stadijuma (Quiroz-Figueroa i sar., 2006). Daljim deobama ćelija na suprotnim polovima globule formiraju se začeci kotiledona, meristema stabla i korena, čime embrion stiče polarnost i prelazi u stadijum srca. Izduživanjem srcastog embriona nastaje embrion u stadijumu torpeda, sa vidljivim kotiledonima. Sa daljim razvojem kotiledona somatski embrion prelazi u kotiledonarni stadijum, koji ima već diferenciran meristem izdanka i korena, kao i vaskularne elemente. Ovaj razvojni stadijum u povoljnim uslovima kulture može da klija, što podrazumeva pojavu i izduživanje radikule, izduživanje hipokotila i ekspanziju kotiledona.

Somatski embrioni koji se razvijaju putem direktne SE (DSE) i indirektno SE (ISE) mogu biti poreklom od jedne ili više ćelija (Quiroz-Figueroa i sar., 2006). Kod embriona poreklom od jedne ćelije uočavaju se koordinisane ćelijske deobe i embrion je povezan sa matičnim eksplantatom svojim bazalnim delom pomoću strukture nalik suspenzoru, dok se kod somatskih embriona sa višećelijskim poreklom ne uočavaju koordinisane ćelijske deobe i ne dolazi do formiranja strukture nalik suspenzoru (Williams i Maheswaran, 1986).

Proučavanja faktora koji kontrolišu morfogenezu biljaka *in vitro* su značajna za poboljšanje regenerativnih protokola i razvoj biotehnologije biljaka, ali i za analizu molekularnih mehanizama koji su u osnovi tih procesa, pre svega SE (Gaj, 2004). Na proces morfogeneze *in vitro* utiču različiti i brojni faktori kao što su: genotip, fiziološko stanje biljke donora eksplantata, izbor eksplantata (starost i tip) i uslovi kulture *in vitro* koji uključuju komponente hranljive podloge za gajenje i fizičke faktore gajenja (svetlost i temperatura). Oba morfogenetska puta, SE i organogeneza, mogu biti indukovana istovremeno, na istom eksplantatu (Ma i Xu, 2002; Mithila i sar., 2003; Subotić i Grubišić, 2007; Ma i sar., 2011; Yang i sar., 2012). Takođe, procesi SE i organogeneze mogu biti razdvojeni u istom eksperimentalnom sistemu, uglavnom korišćenjem različitih komponenti hranljive podloge, na primer različitih koncentracija saharoze (Konieczny i sar., 2008) ili različitih koncentracija egzogeno dodatih regulatora rastenja (Ma i sar., 2011; Yang i sar., 2012).

Organogeneza kao i SE mogu biti indukovane iz različitih tipova eksplantata: listova, petiola, meristema izdanaka, hipokotila, stabla, korenova, semena, kotiledona i zigotskih embriona. Iako se listovi kao eksplantati ne mogu dugo održati u kulturi *in vitro*, prednost odsečaka listova ogleda se u tome da je iz ovih eksplantata moguće indukovati kaluse, korenove, somatske embrione i pupoljke, što je pokazano kod mnogih biljaka (Kairong i sar., 1999; Baque i sar., 2010; Yang i sar., 2012; Singh i sar., 2013). List kao početni eksplant odlikuje se visokim morfogenetskim potencijalom (Fiuk i Rybczynski, 2008b), tako da predstavlja pogodan eksplant za indukciju efikasne regeneracije *in vitro* različitih biljnih vrsta, uključujući i lekovite. U literaturi postoje podaci koji ukazuju na to da su iz lisnih odsečaka vrsta iz familije *Gentianaceae* indukovani procesi SE i organogeneze, kako direktni tako i indirektni. Na primer, regeneracija biljaka procesom organogeneze je postignuta iz lisnih odsečaka lekovite vrste *Swertia hirata* (Chaudhuri i sar., 2008) i ukrasnih interspecijskih hibrida vrsta u okviru roda *Exacum*, opisanih pod nazivom *Exacum* Styer Group (Unda i sar., 2007). Proces SE je indukovano iz lisnih odsečaka *S. hirata* (Wang i sar., 2009; Jha i sar., 2011) i različitih vrsta roda *Gentiana*, na primer *G. kuroo* (Fiuk i Rybczynski, 2008a) i drugih vrsta ovog roda *G. cruciata*, *G. tibetica*, *G. panonica* (Fiuk i Rybczynski, 2008b). Laka dostupnost listova sa biljaka gajenih *in vitro* je posebno značajna u genetičkim i molekularnim istraživanjima, kao i za očuvanje retkih i ugroženih vrsta primenom *in*

*in vitro* tehnika, jer biljke gajene *in vitro* predstavljaju kontinualni izvor eksplantata pri čemu je rizik od kontaminacije početnih eksplantata znatno umanjen. Somatska embriogeneza indukovana u iz odsečaka listova predstavlja model sistem za identifikaciju gena uključenih u indukciju SE cikoriје (*C. intybus*) (Lucau-Danila i sar, 2010) i lucerke (*Medicago truncatula*) (Imin i sar, 2008). Takođe, iz mezofila listova se mogu izolovati protoplasti, koji predstavljaju idealne eksplantate za proučavanje procesa dediferencijacije ćelija (Feher i sar., 2003).

### **1.1.2. Uloga regulatora rastenja u SE i organogenezi**

Među različitim faktorima koji utiču na indukciju SE i organogeneze su i hormonalni činioci, što podrazumeva delovanje regulatora rastenja dodatih u hranljivu podlogu, kao i koncentracije endogenih hormona u eksplantatima (Feher i sar., 2003; Jimenez, 2005). Za razliku od fitohormona koji predstavljaju prirodne supstance koje se sintetišu u biljnom organizmu, regulatori rastenja su sintetička jedinjenja sa hormonskom aktivnošću, čije dodavanje u hranjive podloge za gajenje omogućava usmeravanje razvića tkiva u željenom pravcu (Gutiérrez-Mora i sar., 2012). Postoji nekoliko grupa ovih jedinjenja, među kojima se u kulturi *in vitro* najčešće koriste auksini, citokinini, giberelini i abscisinska kiselina.

Auksini i citokinini su glavni faktori koji putem kontrole razvojnog puta određuju embriogeni odgovor i pravac organogeneze, jer su kod biljaka uključeni u procese regulacije ćelijskog ciklusa, aktiviranja ćelijskih deoba i diferencijaciju ćelija (Feher i sar., 2003; Phillips, 2004; Zhao i sar., 2008). Prvi podaci o regulatornoj ulozi egzogeno dodatih auksina i citokinina u procesu organogeneze datiraju iz sredine dvadesetog veka (Skoog i Miller, 1957). Balans egzogeno dodatih auksina i citokinina je značajan za pravac organogeneze, jer povećanje ovog odnosa u korist auksina indukuje formiranje korenova, dok visoka koncentracija citokinina u odnosu na auksine indukuje formiranje pupoljaka. U najvećem broju slučajeva za indukciju SE je potrebno prisustvo auksina i citokinina (Fiuk i Rybczynski, 2008a; 2008b; Blazquez i sar., 2009; Ghanti i sar., 2009), ali SE može biti postignuta i primenom samo pojedinih auksina (Ma i Xu, 2002; Cantelmo i sar., 2013) ili citokinina (Ma i sar., 2011; Yang i sar., 2012). U nekim slučajevima na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja dolazi do

spontane regeneracije putem SE (Subotić i sar., 2006; Vinterhalter i Vinterhalter, 2002). U literaturi ima podataka o efektima egzogeno dodatih regulatora rastenja u hranljivim podlogama na količinu endogenih biljnih hormona (Jimenez, 2001). Na primer, uočeno je da sintetički regulator rastenja dihlorfenoksisirćetna kiselina (2,4-D) dovodi do povećanja nivoa endogene IAA u kulturi protoplasta (Pasternak i sar., 2002). Egzogeno dodati regulatori rastenja mogu delovati sinergistički ili antagonistički sa endogenim hormonima, čime bi se mogle objasniti razlike u reakciji različitih biljnih vrsta i tipova eksplantata na induktivne podloge istog sastava.

Auksini imaju mnogo različitih fizioloških efekata, na prvom mestu je stimulatívni efekat na izduživanje i deobu ćelija. Smatra se da auksini imaju važnu ulogu u regulaciji indukcije i ekspresije SE, kako egzogeno dodati auksini, tako i endogeni nivoi auksina u tkivu (Jimenez, 2001; Zavatierra i sar., 2010). Među auksinima, u više od 49% protokola za indukciju SE kod različitih biljnih vrsta je korišćen 2,4-D, dok je u 27% korišćena  $\alpha$ -naftalen-sirćetna kiselina (NAA) i sledeći auksini u manjoj meri: indol-3-sirćetna kiselina (IAA) (6%), indol-3-buterna kiselina (IBA) (6%), pikloram (5%) i dikamba (5%) (Jimenez, 2001). Najčešće korišćen regulator rastenja sa auksinskom aktivnošću za indukciju SE kod najvećeg broja vrsta, 2,4-D, je snažan herbicid, koji može delovati ili kao auksin direktno ili kao stresni faktor (Feher i sar., 2003). Prisustvo 2,4-D u hranljivoj podlozi dovodi do promene ekspresije gena i indukcije embriogenog programa, najverovatnije putem metilacije DNK (Karami i Saidi, 2010). U cilju dalje diferencijacije i razvića somatskih embriona potrebno je uklanjanje ili smanjenje koncentracije 2,4-D iz hranljive podloge. Jedna od značajnih karakteristika auksina, polaran transport, je ključna za uspostavljanje auksinskog gradijenta i polarnosti ćelija, odnosno bilateralne simetrije tokom somatske embriogeneze (Jimenez, 2001; Gutiérrez-Mora i sar., 2012). Za uspostavljanje ovog gradijenta potrebni su relativno visoki nivoi slobodne IAA u kompetentnom tkivu (Jimenez, 2001).

Citokinini utiču na različite procese tokom rastenja i razvića biljaka, a imaju centralnu ulogu u stimulaciji ćelijskih deoba u prisustvu auksina. Uloga citokinina u regulaciji SE podrazumeva njihovu ulogu tokom ćelijskih deoba u početnoj fazi SE, ali ne i tokom dalje diferencijacije somatskih embriona (Jimenez, 2001). Od svih citokinina u indukciji SE kod različitih biljnih vrsta se najviše koristi  $N^6$ -benzilaminopurin (BA)

(57% protokola), kinetin (KIN) (37%), tidiazuron (TDZ) (3%) i zeatin (3%) (Jimenez, 2001). Sintetički derivati feniluree, u koje spadaju *N*-fenil-*N'*-(2-hloro-4-piridil) urea (CPPU) i TDZ, imaju veću citokininsku aktivnost u odnosu na adeninske derivate citokinina (Mok i sar., 1982). Dodavanje CPPU u hranljive podloge indukuje niz različitih odgovora, od organogeneze do indukcije kalusa i formiranja somatskih embriona (Subotić i sar., 2009a).

### **1.1.3. Uloga svetlosti u SE i organogenezi**

Svetlost je jedan od najznačajnijih sredinskih faktora koji predstavlja i izvor energije u fotosintezi i kontroliše rastenje i razviće biljaka, odnosno fotomorfogenezu. Optimizacija svetlosnih uslova (fotoperiod, intenzitet i kvalitet svetlosti) je neophodna radi efikasnije morfogeneze u uslovima *in vitro*. Efekat svetlosti na proces morfogeneze *in vitro* je ispitan u različitim eksperimentalnim sistemima i pokazano je da intenzitet, kvalitet svetlosti i dužina fotoperioda utiču na morfogenetski odgovor (Subotić i sar., 2003/4; 2006; 2009c; Reuveni i Evenor, 2007; Cantelmo i sar., 2013). Fotoperiod (dužina dana i noći) značajno utiče na indukciju SE i organogeneze u kulturi različitih tipova eksplantata. U više od 49% protokola do indukcije SE dolazi u uslovima dugog dana, dok je u 44% protokola neophodan mrak za indukciju SE (Gaj, 2004). Takođe, talasna dužina primenjene svetlosti je značajna za indukciju SE, kao i organogeneze.

## **1.2. Biohemijski i molekularni aspekti SE**

Somatska embriogeneza predstavlja model sistem za proučavanje morfoloških, fizioloških, biohemijskih i molekularno-bioloških promena tokom sticanja embriogenog potencijala kao i razvića biljnog embriona (Quiroz-Figueroa i sar., 2006). U cilju proučavanja najranijih faza prelaska somatskih ćelija u embriogene potrebno je definisati markere koji ukazuju na potencijalne mehanizme sticanja embriogene kompetencije u indukovanim ćelijama (Feher i sar., 2003). Ovi markeri moraju biti univerzalni radi poređenja u različitim embriogenim sistemima i mogu biti definisani na morfološkom, citološkom, biohemijskom i molekularnom nivou (Feher i sar., 2003). Molekularni aspekti SE, posebno prelazak somatskih ćelija u embriogene, su



nedovoljno rasvetljeni. Identifikacija proteina i gena koji imaju ulogu u sticanju embriogenog potencijala biljnih ćelija kao markera SE je jedan od najefikasnijih načina za razumevanje molekularnih mehanizama SE, koji pružaju i mogućnost determinisanja embriogenog potencijala ćelija u kulturi pre nastupanja morfoloških promena. Proces tokom koga somatske ćelije stiču embriogene karakteristike uključuje reprogramiranje ekspresije gena i indukciju novog embriogenog razvojnog programa, na osnovu čega se može pretpostaviti da postoje znatne razlike između embriogenih i ne-embriogenih ćelija u vrsti mRNK i proteina, koji se pojavljuju kao rezultat indukcije. Jedan od pristupa u ovim istraživanjima podrazumeva uporednu analizu ukupnih proteina u embriogenom i neembriogenom tkivu, međutim na ovaj način dobija se veliki broj specifičnih proteina koji se ne mogu svi označiti markerima SE (Hahne i sar., 1988; Hibert i sar., 1992). Ekstracelularni proteini su potencijalno dobri markeri SE, jer se pokazalo da imaju ulogu u diferencijaciji biljnih ćelija i njihov broj je mnogo manji od ukupnog broja proteina koji se mogu detektovati tokom samog procesa SE (Tchorbadjieva, 2005). Najveći broj ekstracelularnih proteina čine glikoproteini, među kojima posebnu grupu čine arabinogalaktanski proteini (AGP) koji predstavljaju strukturne proteine ćelijskog zida. Pored toga ispitana je uloga ekstracelularnih kiselih endohitinaza u procesu razvića somatskih embriona kod *D. carota* (De Jong i sar., 1992) i ježevice (*Dactylis glomerata*) (Tchorbadjieva i Pantchev, 2006). U ekstracelularne proteine za koje se pretpostavlja da imaju regulatornu ulogu u SE spadaju i proteini za transfer nespecifičnih lipida (Francois i sar., 2008), kao i proteini nalik germinima (Çaliskan i sar., 2004).

Ekstracelularni proteini, kao što su na primer AGP, mogu direktno ili putem interakcija sa komponentama ćelijskog zida, aktivirati receptorne kinaze koje se nalaze na ćelijskoj membrani, što za posledicu ima aktivaciju prenošenja signala do jedra i promenu ekspresije gena koja može indukovati proces SE (Smertenko i Bozhkov, 2014). *SERK* ("*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE*") geni kodiraju receptorne kinaze uključene u regulaciju SE, za koje se pretpostavlja da deluju kao transmembranski receptori za signale u hranljivoj podlozi i mogu aktivirati embriogenezu (Schmidt i sar, 1997). *SERK* gen je prvi put identifikovan kod *D. carota* (Schmidt i sar, 1997), a zatim i kod *Arabidopsis thaliana* (Hecht i sar, 2001) i velikog broja drugih vrsta. U genomima do sada istraženih vrsta nalazi se nekoliko gena koji

kodiraju SERK, na primer kod *A. thaliana* to je familija od 5 gena, a kod *M. truncatula* familija od 6 gena (Smertenko i Bozhkov, 2014). U regulaciju SE su uključeni transkripcioni faktori među kojima su najbolje okarakterisani *LEC* geni ("*ARABIDOPSIS LEAFY COTYLEDON*"), *BBM* geni ("*BABY BOOM*"), *WUS* geni ("*WUSCHEL*") i *AGL15* geni ("*AGAMOUS-like 15*"). Iako je napravljen značajan napredak u identifikaciji faktora koji učestvuju u indukciji, percepciji i transdukciji signala u SE, rezultati ovih istraživanja su još uvek fragmentarni da bi se SE mogla objasniti na molekularnom nivou (Smertenko i Bozhkov, 2014).

### **1.3. Arabinogalaktanski proteini**

Ćelijski zid, kao sastavni deo biljnih ćelija koji ih okružuje, ima ulogu u prijemu i prenosu informacija o spoljašnjim faktorima i o kontaktu sa drugim ćelijama. Osim toga što ćelijski zidovi posreduju u prenosu informacija između ćelija putem apoplasta i simplasta, oni predstavljaju i izvor signalnih molekula (Brownlee, 2002; Seifert i Blaukopf, 2010; Smertenko i Bozhkov, 2014). Ćelijski zidovi takođe predstavljaju glavnu strukturnu potporu i zaštitu biljnom organizmu. Primarni ćelijski zid je dinamična struktura koja konstantno podleže promenama tokom ćelijskog rasteanja i diferenciranja. Ove promene se odvijaju kroz modifikacije strukture i sastava ćelijskog zida koje prate morfogenetske procese tokom razvića organa i embriona. Primarni ćelijski zid se prvenstveno sastoji od polisaharida kao što su celuloza, hemiceluloza i pektini, a u manjoj meri od proteina. Ove komponente formiraju kompleksnu interaktivnu mrežu označenu kao ekstracelularni matriks (ECM) (Carpita i Gibeaut, 1993; Knox, 1995; Seifert i Blaukopf, 2010). Iako proteini čine oko 10% ukupne suve težine primarnih ćelijskih zidova, oni predstavljaju njegovu veoma važnu komponentu, kao strukturni proteini i kao enzimi (hidrolaze, proteaze, glikozidaze, peroksidaze, kinaze, esteraze i ekspanzini). Strukturni proteini ćelijskog zida su vrlo raznovrsni i bogati određenim aminokiselinama, na primer hidroksiprolinom i glicinom, na osnovu čega su svrstani u grupe.

Glikoproteini bogati hidroksiprolinom (HGRP) predstavljaju superfamiliju proteina ćelijskog zida koja je otkrivena pre nekoliko decenija (Lampert i Northcote, 1960). Ovu veoma kompleksnu grupu čine strukturno različiti proteini koji imaju uloge

u različitim aspektima rastenja i razvića biljaka: visoko glikozilovani AGP, umereno glikozilovani ekstenzini (EXT) i slabo glikozilovani proteini bogati prolinom (PRP). Takođe postoje hibridni i himerni oblici HGRP molekula (Showalter i sar., 2010). Bioinformatičkom analizom genoma *A. thaliana* identifikovano je 166 glikoproteina bogatih hidroksiprolinom, među kojima su 85 AGP, 59 EXT, 18 PRP i 4 AGP/EXT hibridna proteina (Showalter i sar., 2010).

AGP predstavljaju grupu kompleksnih proteoglikana pronađenih u svim tkivima viših biljaka. AGP su prisutni u ćelijskim membranama, ćelijskim zidovima i međućelijskom prostoru. Pored toga mogu se transportovati iz ćelija u hranljive podloge na kojima su *in vitro* gajeni različiti tipovi biljnih ćelija, tkiva i organa (Knox, 1995). AGP su pronađeni kod svih biljaka, od algi (Eder i sar., 2008; Popper i sar., 2011) do mahovina, npr. kod *Physcomitrella patens* (Lee i sar., 2005) i skrivenosemenica (Schultz i sar., 2000). Arabinogalaktanske proteine kodira velika familija gena što govori o njihovoj raznovrsnosti i brojnim ulogama u regulaciji procesa rastenja i razvića biljaka (Coimbra i sar., 2009).

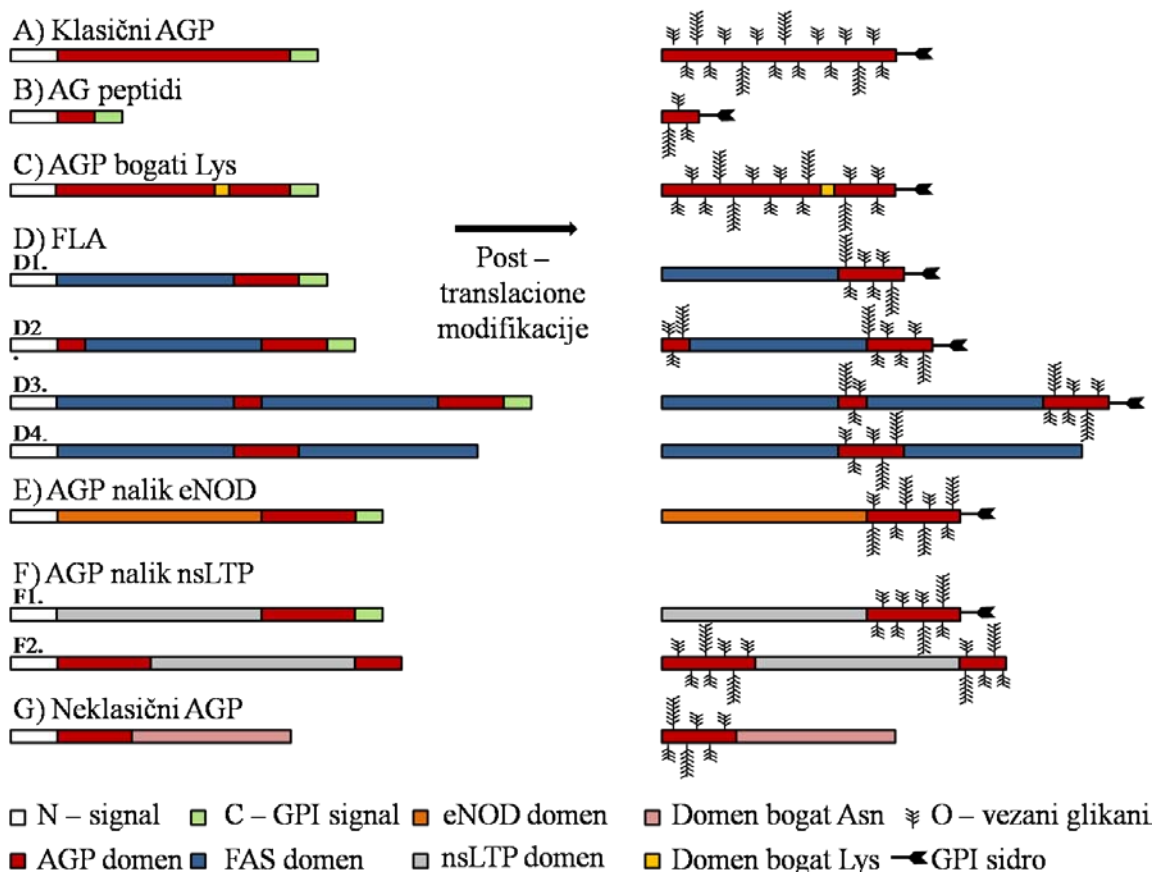
### 1.3.1. Struktura i podela AGP

Proteinski deo kod najvećeg broja AGP molekula čini 1-10% molekulske mase (Ellis i sar, 2010). AGP molekule karakteriše velika strukturna raznovrsnost proteinske osnove molekula i prisustvo različitih proteinskih domena. AGP su podeljeni u 7 grupa na osnovu primarne strukture (Gaspar i sar., 2001; Schultz i sar., 2002; Ma i Zhao, 2010).

- A) klasični AGP,
- B) AG peptidi,
- C) AGP bogati lizinom
- D) AGP nalik fasciklinu (FLA),
- E) AGP nalik ranom nodulinu (eNOD-AGP) i AGP nalik fitocijaninu (PLA),
- F) AGP nalik proteinima za transfer nespecifičnih lipida (nsLTP-AGP) i
- G) neklasični AGP

Za klasične AGP (**Slika 1A**) je karakteristično prisustvo tri različita domena: sekrecionog signala na N-terminusu, centralnog AGP domena i hidrofobnog domena na

C-terminusu (Du i sar., 1996). Polipeptidni lanci AGP nakon translacije podležu znatnim modifikacijama, koje obuhvataju supstituciju transmembranskog hidrofobnog domena na C-terminusu glikozil fosfatidilinozitolnim “sidrom” (GPI-sidro), kao i uklanjanje signalne sekvence na N-terminusu, hidroksilaciju prolina u okviru AGP domena i glikozilaciju (**Slika 1**). Klasični AGP i AG peptidi predstavljaju osnovnu formu AGP, jer osim AGP domena koji predstavlja mesto za O-glikozilaciju ne sadrže druge domene (Ellis i sar., 2010). Klasični AGP i AG peptidi ne sadrže mesta za N-glikozilaciju (Johnson i sar., 2003). AGP domen je bogat aminokiselinama Pro, Ala, Ser i Thr i sadrži AG-II glikomodule, koji predstavljaju specifične dipeptide koji se ponavljaju - Ala-Pro, Pro-Ala, Ser-Pro, Pro-Ser, Thr-Pro, Pro-Thr, Val-Pro, Pro-Val i Gly-Pro (Ellis i sar., 2010; Showalter i sar., 2010; Nquema-Ona i sar., 2012). Dužina centralnog domena varira kod različitih AGP. Prisustvo najmanje 2 nekontinualna aminokiselinska ostatka Pro koji su razdvojeni sa ne više od 11 aminokiselina predstavlja motiv za O-glikozilaciju [(A/S/T)-P-X(0,10)-(A/S/T)P] (Schultz i sar., 2002; Johnson i sar., 2003; Faik i sar., 2006). AG peptidi (**Slika 1B**) sadrže kratki centralni AGP domen i njihova veličina varira od 58 do 87 aminokiselina kod *A. thaliana* (Showalter i sar., 2010). AG peptidi (**Slika 1B**) su prvi put identifikovani kod pšenice (*Triticum aestivum*) (Fincher i sar., 1974).



**Slika 1.** Shematski prikaz različitih proteinskih osnova AGP (levo) i predviđena struktura nativnih AGP nakon obrade i post-translacionih modifikacija (desno) koje uključuju uklanjanje N-terminalne signalne sekvence i C-hidrofobnog domena i vezivanje GPI sidra za C-terminus, kao i hidroksilaciju Pro do Hyp i supstituciju sa O-vezanim glikanima. A. Klasični AGP; B. AG peptidi; C. AGP bogati Lys; D. FLA-AGP nalik fasciklinu. Postoji 4 podgrupa FLA: D1. FLA koji sadrže 1 AGP domen i 1 FAS domen; D2. FLA koji sadrže 2 AGP domena i 1 FAS domen; D3. FLA koji sadrže 2 AGP domena i 2 FAS domena; D4. FLA koji sadrže 1 AGP domen i 2 FAS domena; E. AGP nalik eNOD - AGP nalik ranom nodulinu. F. AGP nalik nsLTP – AGP nalik proteinima za transfer nespecifičnih lipida. Postoje dve podgrupe nsLTP – AGP kod *O. sativa*: F1. nsLTP domen se nalazi između N – signalnog peptida i AGP domena; F2. nsLTP domen deli AGP domen na dva dela i nema GPI signala na C-terminusu; G. Neklasični AGP sadrže region bogat Asn na C-terminusu.

Izraz "himerni AGP" se koristi za AGP koji osim AGP domena poseduju dodatne domene, kao što su AGP bogati Lys, FLA, AGP nalik ranom nodulinu i AGP

nalik proteinima za transfer nespecifičnih lipida (Nquema-Ona i sar., 2012). Za AGP bogate Lys (**Slika 1C**) karakteristično je prisustvo kratkog baznog regiona bogatog Lys koji se nalazi u okviru centralnog domena. Kod *A. thaliana* ovu grupu čine tri proteina AtAGP17, AtAGP18 i AtAGP19 od kojih dva sadrže GPI-sidro (Sun i sar., 2005; Zhang i sar., 2011). Proteinski deo FLA molekula (**Slika 1D**) osim predviđenih AGP glikozilovanih regiona sadrže i ćelijske adhezivne domene označene kao fasciklin domeni (FAS) (Johnson i sar., 2003). Fasciklini (fasciklin I, II i III) su membranski glikoproteini koji su prvi put identifikovani tokom razvića nervnog sistema embriona insekata kao adhezivni molekuli sa ulogom u regulaciji rasta aksona (Bastiani i sar., 1987; Patel i sar., 1987; Elkins i sar., 1990). U istraživanjima koja su potom usledila proteini sa FAS domenom su pronađeni kod sisara, viših biljaka, algi, kvasaca i bakterija, ali je kombinovanje FAS domena sa visokoglikozilovanim AGP domenom jedinstvena odlika biljaka (Johnson i sar., 2011). Veličina FAS domena varira od 110 do 150 aminokiselina i karakteriše ga postojanje 2 visoko konzervirana regiona (H1 i H2) od oko 10 aminokiselina, između kojih se nalazi adhezivni motiv (Kawamoto i sar., 1998). FLA predstavljaju heterogenu grupu i klasifikovani su u 4 grupe na osnovu broja FAS domena, broja AGP domena i prisustva GPI sidra (Johnson i sar., 2003; Ma i Zhao, 2010). Ovi proteini mogu sadržati jedan ili dva AGP domena i jedan ili dva FAS domena. Veličina FLA *A. thaliana* varira od 247 do 462 aminokiseline (Johnson i sar., 2003; Showalter i sar., 2010).

AGP nalik eNOD sadrže domen koji je karakterističan za fitocijanine, a predstavlja mesto vezivanja bakra (Mashiguchi i sar., 2004, Seifert i Roberts, 2007, Poon i sar., 2012). Poon i saradnici (2012) su ovu grupu označili kao AGP nalik fitocijaninu (PLA). Ovaj domen se nalazi između N-terminalnog signalnog peptida i AGP domena (**Slika 1E**), kao i nsLTP domen (Ma i Zhao, 2010). Domen nsLTP (**Slika 1F**) je karakterističan za AGP nalik proteinima za transfer nespecifičnih lipida (AGP nalik nsLTP), kao što je ksilogen (Motose i sar., 2004).

Neklasični AGP (**Slika 1G**) osim N-terminalnog sekrecionog domena i centralnog domena sadrže i C-terminalni domen koji je bogat Cys ili Asn (Gaspar i sar., 2001). Neklasični AGP ne sadrže signal za dodavanje GPI-sidra (Gaspar i sar., 2001).

Prve cDNK sekvence koje kodiraju proteinski deo molekula AGP su dobijene iz ćelijske suspenzije kruške (*Pyrus communis*) (Chen i sar., 1994) i iz stubića tučka

duvana (*Nicotiana glauca*) (Du i sar., 1994). Projekti sekvenciranja genomske DNK su omogućili identifikaciju velikog broja gena koji kodiraju proteinske delove molekula AGP (Gaspar i sar., 2001). Proteinski deo AGP molekula kodiraju članovi multigenijskih familija koje se sastoje od 47-85 članova kod *A. thaliana* (Shultz i sar., 2002; Johnson i sar., 2003; Showalter i sar., 2010) i 69 članova kod pirinča (*Oryza sativa*) (Mao i Zhao, 2010). Shultz i saradnici (2002) su uradili prvu obimnu bioinformatičku analizu radi identifikacije AGP gena u genomu *A. thaliana*. Identifikovali su 47 različitih AGP koji su klasifikovani u 4 grupe: 13 klasičnih AGP, 3 AGP bogata Lys, 10 AG peptida i 21 FLA. Osam godina kasnije Showalter i saradnici, takođe primenom bioinformatičkog pristupa, pronašli su 85 AGP kod *A. thaliana*, uključujući 22 klasična AGP, 3 AGP bogata Lys, 16 AG peptida, 21 FLA, 17 plastocijanin AGP i 6 drugih himernih AGP. Ma i Zhao (2010) su identifikovali 69 AGP kod *O. sativa*, uključujući 13 klasičnih AGP, 15 AG peptida, 3 neklasična AGP, 3 AGP nalik nodulinu, 8 AGP nalik proteinima za transfer nespecifičnih lipida AGP i 27 FLA. Osim kod *A. thaliana* i *O. sativa*, 34 FLA gena su identifikovana kod *T. aestivum* (Faik i sar., 2006). Jun i Xiaoming su (2012) su u anotiranom genomu kineskog kupusa (*Brassica rapa*) identifikovali 33 FLA. FLA geni su identifikovani još kod topole (*Populus tremula x P. alba*) (Lafarguette i sar., 2004), *Pinus taeda* (Loopstra i sar., 2000; Yang i sar., 2005), lepog čoveka (*Zinnia elegans*) (Dahiya i sar., 2006) i pamuka (*Gossypium hirsutum*) (Huang i sar., 2008).

Nakon sinteze polipeptidnog lanca dolazi do uklanjanja C – terminalnog peptida dejstvom transamidaza i dodavanja GPI-sidra na C-terminus proteinskog dela AGP molekula (**Slika 1**), a obe reakcije se odvijaju u endoplazmatičnom retikulumu. Mesto dodavanja GPI-sidra je označeno sa  $\omega$ , odnosno mesto odsecanja C-hidrofobnog domena se nalazi između  $\omega$  i  $\omega+1$  pozicije. Pretpostavljene GPI signalne sekvence AGP molekula imaju konzervisane karakteristike koje se sreću kod GPI signalnih sekvenci životinja. Kod konzervisanih GPI signalnih sekvenci na  $\omega$  i  $\omega+2$  pozicijama nalaze se alifatične aminokiseline, iza kojih se nalazi kratki „spejser“ (4-8 aminokiselina) i hidrofobni rep od 14-18 aminokiselina (Eisenhaber i sar., 1998; Schultz i sar., 1998). GPI-sidro se sastoji od oligosaharidnog lanca, etanolamina i lipida. Oligosaharidni lanac se sastoji od ostataka manoze ili  $\beta$ -galaktoze i acetilglukozamina i povezuje proteinski deo AGP molekula sa spoljašnjom stranom ćelijske membrane, tako što je preko

etanolamin fosfata povezan sa C-terminusom proteina, a preko glukozamina i inozitola sa fosfoceramidima koji su uronjeni u membranu. Lokalizacija AGP koji sadrže GPI-sidro na spoljašnjoj strani ćelijske membrane ukazuje na moguće biološke uloge u prijemu ekstracelularnih signala i posredovanju u interakcijama između ćelija. Schultz i saradnici (1998) predlažu dva moguća mehanizma putem kojih bi AGP sa GPI sidrom mogli biti uključeni u signalnu transdukciju. Prvi mehanizam podrazumeva oslobađanje AGP sa ćelijske membrane delovanjem fosfolipaza, pri čemu bi celi AGP molekuli ili oligosaharidi dobijeni degradacijom glikanskih delova AGP molekula mogli imati ulogu signalnih molekula. Drugi mehanizam podrazumeva interakciju AGP koji poseduju GPI sidro sa transmembranskim proteinima koji učestvuju u transdukciji signala. Zhang i saradnici (2011) su pretpostavili da bi se pomenute interakcije mogle odvijati u mikrodomenima ćelijske membrane ("lipid rafts"), koji su bogati sterolima i glikosfingolipidima, a sadrže i transmembranske proteine (receptore, receptorne kinaze i jonske kanale), kao i proteine koji sadrže GPI-sidro. AGP su najverovatnije asocirani sa ovim mikrodomenima i mogu interagovati sa receptornim kinazama (Zhang i sar., 2011).

Dalja posttranslaciona modifikacija zrelog proteinskog lanca obuhvata hidroksilaciju prolina i glikozilaciju. Hidroksilaciju prolina katalizuje prolil-4-hidrolaza u endoplazmatičnom retikulumu. Glikozilaciju, odnosno supstituciju hidroksiprolina arabinogalaktanskim lancima, kao i biosintezu ovih lanaca katalizuju glikoziltransferaze u Goldžijevom aparatu. S obzirom na veliku kompleksnost ugljeno-hidratnog dela AGP molekula, postoji više glikoziltransferaza koje učestvuju u sintezi glikanskih lanaca, kao što su galaktoziltransferaze, L - arabinoziltransferaze, L – fukoziltransferaze i glukuronozil-transferaze (Endo i sar., 2013; Tan i sar., 2012). Ugljeno-hidratni deo AGP molekula je preovlađujući i čini više od 90% molekulske mase, a uglavnom se sastoji od arabinoze i galaktoze sa malim količinama uronskih kiselina (Seifert i Roberts, 2007). Ugljeno-hidratna komponenta AGP molekula je u obliku polisaharidnog lanca, tipa II arabinogalaktana (AG) koga čine (1→3)-β-D-vezani galaktozni molekuli supstituisani bočnim (1→6)-β-D galaktanskim lancima. Bočni lanci su dalje supstituisani L-arabinozom i u manjoj meri L-ramnozom, L-fukozom, D-manozom, D-ksilozom, D-glukozom, D-glukozaminom i uronskim kiselinama (D-glukuronskom i D-galakturonskom kiselinom) (Showalter i sar., 2001). Ovi lanci mogu biti kiseli i



neutralni (Ellis i sar., 2010). Kod kiselih su karboksilne grupe terminalnih uronskih kiselina slobodne ili mogu da grade metil estre, dok kod neutralnih se na terminalnim pozicijama uglavnom nalaze ostaci arabinoze i ramnoze. Kod nekih AGP može biti prisutan strukturni motiv karakterističan za ekstenzine (Ser-(Pro)<sub>2-3</sub>), kod kojih nakon hidroksilacije ostataka Pro, koji su poređani u nizu, dolazi do vezivanja kratkih oligoarabinozida O-glikozidnom vezom (Ellis i sar., 2010). Sastav ugljeno-hidratne komponente AGP molekula može znatno varirati kod različitih vrsta, između organa jedne iste vrste i čak može biti razvojno regulisan u okviru istog organa, kod različitih tipova ćelija (Pennel i sar., 1991; Nquema-Ona i sar., 2012). Biosinteza i degradacija AGP u biljnim tkivima su koordinisano regulisani i međusobno zavisni procesi (Endo i sar., 2013). Degradaciju ugljeno-hidratnih delova AGP molekula katalizuju različite glikozidaze, pri čemu se oslobađaju oligosaharidi koji mogu predstavljati potencijalne signalne molekule, što je u skladu sa signalnom ulogom oligosaharida kod biljaka (Etzler, 1998; Smertenko i Bozhkov, 2014).

Ugljeno-hidratni deo AGP molekula je O-glikozidnom vezom povezan za proteinsku osnovu, preko kiseonika na hidroksiprolinu, ređe preko Ser ili Thr (Showalter, 2001). Međutim, postoje i AGP kod kojih se glikozilacija odvija osim putem O-glikozilacije i preko N-glikozidne veze. N-glikozilacija se javlja kada proteinski deo sadrži sekvencu Asn-Xaa-Ser/Thr, gde Xaa može biti bilo koja aminokiselina osim Pro (Lerouge i sar., 1998). Mnogi himerni AGP, kao što su FLA, sadrže N-glikozidnu vezu (Johnson i sar., 2003). N-glikozilacija se odvija na 2-8 mesta koja se najčešće nalaze u okviru FAS domena FLA proteina (Johnson i sar., 2003).

Primena elektronske mikroskopije je omogućila da se bliže odredi struktura molekula AGP. Na osnovu ovih proučavanja su predložena dva modela ovih molekula: globularni ("wattle blossom") ili linearni ("twisted hairy rope"). Kod "wattle blossom" modela polisaharidni lanci su složeni u globularne jedinice koje su prikačene za proteinsku osnovu, tako da npr. AGP šargarepe siromašni Hyp imaju sferoidalni oblik. AGP izolovan iz celog zrna ovsa (*Avena sativa*) po svojoj strukturi odgovara "wattle blossom" modelu AGP (Göllner i sar., 2011). Kod "twisted hairy rope" modela oligosaharidni lanci su omotani oko proteina, kao kod fibrilarnog molekula AGP iz gumirabike koja se skuplja iz povređenog drveta akacije (*Acacia senegal*) (Qi i sar., 1991).

### 1.3.2. Pregled metoda za detekciju, lokalizaciju i proučavanje AGP

Postoji nekoliko metoda pomoću kojih se proučava distribucija i uloga AGP tokom rastanja i razvića biljaka. Najčešće korišćen pristup proučavanju uloge AGP tokom morfogeneze biljaka je upotreba  $\beta$ -D-glukozil Yariv reagensa ( $\beta$ GlcY), koji se specifično vezuje za većinu AGP molekula (Ellis i sar., 2010). Specifična interakcija između  $\beta$ GlcY i AGP se koristi za lokalizaciju, izolaciju i kvantifikaciju arabinogalaktanskih proteina. Yariv reagensi obuhvataju grupu sintetičkih jedinjenja crvene boje, od kojih se samo  $\beta$ -glukozil i  $\beta$ -galaktozil Yariv reagensi ( $\beta$ GalY) specifično vezuju za AGP molekule, za razliku od  $\alpha$ -oblika i  $\beta$ -manozil Yariv-a koji se ne vezuju i često služe kao negativna kontrola (Yariv i sar., 1967). Priroda vezivanja AGP za  $\beta$ -galaktozil Yariv reagens je nedavno otkrivena identifikacijom dela AGP molekula koji je neophodan za interakciju sa Yariv reagensom (Kitazawa i sar., 2013). Ovi autori su otkrili da su za formiranje precipitata sa  $\beta$ GalY potrebni  $\beta$ -1,3-galaktooligosaharidi koji su sastavni deo ugljeno-hidratne komponente AGP molekula, a sadrže više od sedam galaktoznih ostataka. Oni svakako ne isključuju mogućnost da neki AGP imaju neku drugu ciljnu strukturu za koju se vezuje  $\beta$ GalY osim dugih  $\beta$ -1,3-galaktozil lanaca. Johnson i saradnici (2003) su pokazali da  $\beta$ GlcY precipitira FLA, što ukazuje na to da dele strukturne karakteristike sa AGP. Postoji pretpostavka da  $\beta$ GlcY, vezivanjem i precipitacijom AGP u ćelijskom zidu, dovodi do inaktivacije AGP i samim tim sprečava obavljanje njihove funkcije (Thompson i Knox, 1998). Pionirska studija je pokazala da  $\beta$ GlcY inhibira deobe ćelija u suspenziji ćelija *Rosa sp.* u zavisnosti od primenjene koncentracije, ukazujući na ulogu AGP u deobi ćelija (Serpe i Nothangel, 1994).  $\beta$ GlcY dovodi do gubitka vijabilnosti ćelija *A. thaliana* putem programirane ćelijske smrti (Gao i Showalter, 1999). Capataz-Tafur i saradnici (2011) su ukazali na važnu ulogu AGP u ćelijskom rastanju i njihovoj agregaciji, jer je pod dejstvom  $\beta$ GlcY u suspenziji ćelija šećerne repe (*Beta vulgaris*) došlo do redukcije rasta ćelija i smanjenja veličine ćelijskih agregata. Tretman sa  $\beta$ GlcY u kulturi ćelija *A. thaliana* dovodi do promena u ekspresiji gena, koji je sličan transkripcionom profilu koji izaziva mehanička povreda (Guan i Nothangel, 2004).

Specifična interakcija između  $\beta$ GlcY i AGP se koristi za kvantifikaciju pomoću radialne difuzije (van Holst i Clarke, 1985). Ukrštena elektroforeza predstavlja metodu

pomoću koje se mogu razdvojiti i uporediti različiti tipovi AGP u hranljivoj podlozi i tkivu tokom različitih razvojnih procesa (van Holst i Clarke, 1986; Gell i sar, 1986). Na primer, pomoću ove metode je utvrđeno da svako tkivo sadrži specifičan set AGP (van Holst i Clarke, 1986).

Imunohistohemijske tehnike omogućavaju identifikaciju i preciznu lokalizaciju polimera ćelijskog zida *in situ* (Knox, 2008). Ove metode koriste monoklonalna antitela (Moller i sar., 2008). Monoklonalna antitela koja se najčešće koriste u proučavanju funkcije i lokalizacije AGP su prikazana u **Tabeli 1**. Monoklonalna antitela su usmerena ka ugljeno-hidratnoj komponenti molekula AGP, koja podleže degradaciji i modifikaciji tokom diferencijacije i morfogeneze, tako da se imunohistohemijskom lokalizacijom mogu pratiti ove promene. AGP epitopi su uključeni u različite morfogenetske puteve kao markeri ćelijskog identiteta (Seifert i Roberts, 2007). Pomoću različitih antitela je istražena lokalizacija AGP epitopa tokom različitih razvojnih procesa. Lokalizacija AGP epitopa je vremenski i prostorno regulisana tokom androgeneze kod uljane repice (*Brassica napus* L.cv.Topas) (Tang i sar., 2006) i zigotske embriogeneze kod *A. thaliana* (Hu i sar., 2006). Konieczny i saradnici (2007) su pomoću monoklonalnih antitela ukazali na moguću ulogu AGP tokom organogeneze u kalusnim kulturama *T. aestivum*. S obzirom na to da različite proteinske osnove AGP molekula mogu biti glikozilovane ugljeno-hidratnim lancima koji sadrže iste epitope, monoklonalna antitela koja prepoznaju ugljeno-hidratne delove nisu specifična za pojedine AGP molekule. Takođe je verovatno da monoklonalna antitela ne prepoznaju sve glikoforme koje karakteriše velika heterogenost u jednom AGP molekulu. Osim antitela koja prepoznaju ugljeno-hidratne delove molekula AGP, postoje i ona koja su usmerena ka proteinskim delovima (Gao i Showalter., 2000). Produkcija antitela koja specifično prepoznaju region bogat Lys u proteinskim sekvencama LeAGP1 paradajza (*Lycopersicon esculentum*) (Gao i Showalter., 2000), AGP17 i AGP19 *A. thaliana* (Yang i sar., 2011) i drugih biljaka obezbeđuje načine za proučavanje njihove distribucije u tkivu i ćelijama, a na taj način i njihove funkcije. Region bogat Lys nije glikozilovan, što omogućava kreiranje antitela specifičnih za pojedinačni AGP molekul koja mogu reagovati sa proteinskom osnovom. Ova istraživanja su pokazala da jedna proteinska osnova može biti različito glikozilovana u pojedinim organima *L. esculentum* (Gao i Showalter., 2000).

Mogućnost proučavanja uloga pojedinih AGP gena je značajno povećana korišćenjem genetičkih i molekularno-bioloških tehnika. Kloniranje pojedinih AGP gena i njihova funkcionalna karakterizacija, kao i analize mutanata su omogućili da se odredi funkcija pojedinih AGP gena uglavnom kod *A. thaliana*, ali i kod drugih biljaka.

**Tabela 1.** Spisak monoklonalnih antitela koji se specifično vezuju za arabinogalaktanske proteine

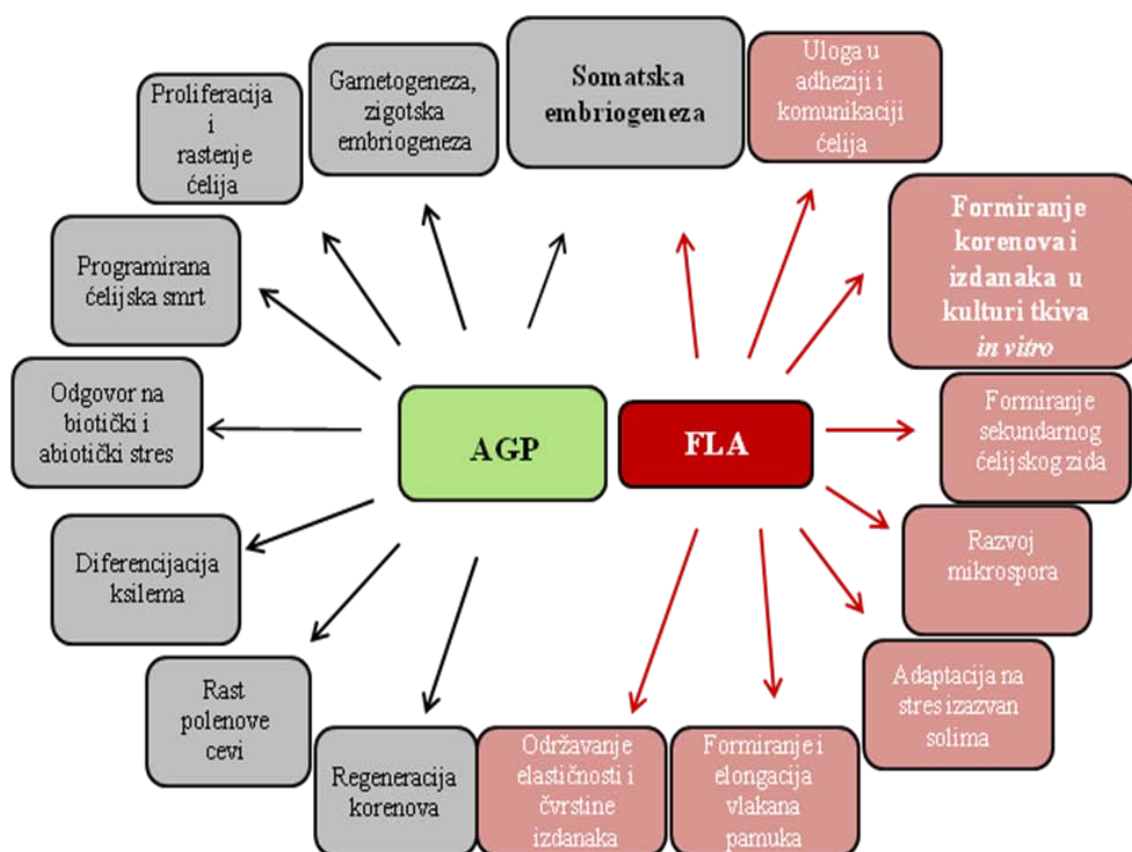
<b>Antitelo</b>	<b>Antigen</b>	<b>Epitop</b>	<b>Referenca</b>
<b>LM2</b>	AGP iz pirinča	$\beta$ -D-GlcA	Smallwood i sar. (1994); Yates i sar. (1996)
<b>JIM4</b>	AGP iz šargarepe	$\beta$ -D-GlcA-(1,3)- $\alpha$ -D-GalA-(1,2)- $\alpha$ -L-Rha	Yates i sar. (1996)
<b>JIM8</b>	AG iz šećerne repe	Nepoznat	Pennel i sar. (1991)
<b>JIM13</b>	AGP iz šargarepe	$\beta$ -D-GlcA-(1,3)- $\alpha$ -D-GalA-(1,2)- $\alpha$ -L-Rha	Yates i Knox. (1994); Yates i sar. (1996)
<b>JIM14</b>	AGP iz šargarepe	Nepoznat	Yates i Knox. (1994); Yates i sar. (1996)
<b>JIM15</b>	AGP iz šargarepe	Nepoznat	Yates i Knox. (1994); Yates i sar. (1996)
<b>JIM16</b>	AGP iz šargarepe	Nepoznat	Yates i Knox. (1994); Yates i sar. (1996)
<b>MAC204</b>	AGP iz graška	Nepoznat	Bradley i sar. (1988); Pennel i sar. (1989)
<b>MAC207</b>	AGP iz graška	$\beta$ -GlcA-(1,3)- $\alpha$ -GalA-(1,2)-Rha	Bradley i sar. (1988); van den Bosch i sar. (1989)
<b>PCBC3</b>	AGP iz duvana	Nepoznat	Fergusson i sar. (1999)
<b>CCRC-M7</b>	Ramnogalakturonan I	Arabinolizovani $\beta$ -(1,6)-Gal	Steffan i sar. (1995)
<b>PN16.4B4</b>	AG iz duvana	Nepoznat	Norman i sar. (1986)
<b>LM6</b>	Arabinan iz šećerne repe	A-(1,5)-L-arabinosil heptasaharid	Lee i sar. (2005)
<b>LM14</b>	AGP iz šargarepe	Ugljenohidratni lanci bogati arabinozom i galaktozom	Moller i sar. (2008)
<b>ZUM15</b>	AGP iz semena šargarepe	nepoznat	Kreuger i van Holst, 1995
<b>ZUM18</b>	AGP iz semena šargarepe	nepoznat	Kreuger i van Holst, 1995

### 1.3.3. Biološke uloge AGP

Arabinogalaktanski proteini su uključeni u mnoge fiziološke procese rasteња i razvića biljaka, uključujući vegetativno i reproduktivno razviće i ćelijsko rasteње (**Slika 2**). AGP imaju ulogu u ćelijskoj deobi, rasteњу ćelija (Serpe i Nothangel, 1994; Ding i Zhu, 1997; Yang i sar., 2007; Ben Amar i sar., 2010; Capataz-Tafur i sar., 2011) i programiranoj ćelijskoj smrti (Gao i Showalter, 1999; Chaves i sar., 2002). Postoje dokazi da AGP učestvuju u izduživanju polenove cevi (Lee i sar., 2008), rasteњу i razviću korenova (van Hengel i Roberts, 2003) i diferencijaciji ksilema (Motosé i sar., 2004). AGP imaju ulogu u odgovoru biljaka na biotički stres, kao što je infekcija biljnog tkiva sa *Agrobacterium tumefaciens* (Gaspar i sar., 2004) i *Fusarium oxysporium* (Xie i sar., 2011), i abiotički stres, kao što su mehanička povreda biljaka (Guan i Nothangel, 2004; Fragkostefanakis i sar., 2012), povišena koncentracija soli (Lamport i sar., 2006) i hipoksija (Fragkostefanakis i sar., 2012). AGP učestvuju u kontroli procesa zigotske embriogeneze (Hu i sar., 2006; Yu i Zhao, 2012), gametogeneze (Demesa-Arevalo i Vielle-Calzada, 2013; Acosta-Garcia i Vielle-Calzada 2004; Coimbra i sar., 2009) i androgeneze (Tang i sar., 2006; Borderies i sar., 2004). U velikom broju istraživanja pokazana je uloga AGP u regulaciji SE, tako što su AGP koji su izolovani iz kondicionirane hranljive podloge na kojoj su gajene embriogene kulture dodavani ne-embriogenim kulturama, što je stimulisalo SE u ćelijskim kulturama *D. carota* i smrčé (*Picea abies*) i ukazalo na esencijalnu ulogu specifičnog seta AGP u SE (Kreuger i van Holst, 1993; Egertsdotter i Van Arnold, 1995). Smatra se da se embriogeni potencijal somatskih ćelija u kulturi povećava u prisustvu AGP koji sadrže *N*-vezane glikane (van Hengel i sar., 2001; van Hengel i sar., 2002). Delovanjem hitinaza na AGP molekule koji sadrže *N*-acetilglukozamin (GlcNAc), monomer hitina, u svojim glikanskim lancima dolazi do oslobađanja oligosaharida koji se ponašaju kao signalni molekuli koji stimulišu SE (van Hengel i sar., 2001). Nasuprot tome, Poon i saradnici (2012) su demonstrirali da je proteinski deo GhPLA1 molekula odgovoran za stimulisanje SE kod *G. hirsutum*, tako što su iz AGP frakcije koja se nalazi u hranljivoj podlozi na kojoj je gajen embriogeni kalus *G. hirsutum*, izolovali ekstracelularni AGP protein GhPLA1 koji je nakon dearabinozilacije i kompletne deglikozilacije i dalje zadržavao svoju funkciju. Na ovaj način je identifikovan pojedinačni AGP koji je uključen u regulaciju

SE, ali mehanizmi pomoću kojih se ostvaruje ova regulacija još uvek nisu otkriveni (Poon i sar., 2012). AGP imaju važnu ulogu komunikaciji između ćelija i interakcijama sa komponentama ECM tokom rasteanja i razvića biljaka (Shultz i sar., 1998; Shi i sar., 2003; Sardar i sar., 2006).

I pored svih saznanja o biološkim ulogama AGP, precizan način delovanja AGP molekula je i dalje nepoznat. Najverovatnije je da svi delovi molekula AGP (proteinski deo, ugljeno-hidratna komponenta i GPI-sidro) imaju određene uloge u ostvarivanju bioloških uloga AGP (Ellis i sar., 2010). Na osnovu amfipatične prirode ovih molekula može se pretpostaviti njihova uloga medijatora između ćelijskog zida, ćelijske membrane i citoplazme (Seifert i Roberts, 2007).



**Slika 2.** Shematski prikaz različitih bioloških uloga AGP i FLA. Crnim strelicama označene su biološke uloge AGP; crvenim strelicama označene su biološke uloge FLA

### 1.3.4. Biološke uloge FLA

Poslednjih godina su postignuti značajni rezultati u otkrivanju uloga FLA u rastenju i razviću biljaka i adaptaciji na faktore spoljašnje sredine, iako su mehanizmi delovanja ovih proteina nedovoljno rasvetljeni (**Slika 2**). Geni koji kodiraju FLA su članovi multigenskih familija kod biljaka. Veliki broj *FLA* gena u genomima biljaka i njihova strukturna različitost mogli bi ukazivati na njihove različite uloge tokom razvića i adaptacije biljaka. Ekspresija *FLA* gena je razvojno regulisana i takođe je regulisana stresom (Faik i sar., 2006; Johnson i sar., 2003). Na primer, *FLA* geni eukaliptusa (*Eucalyptus nitens*) (*EniFLA1-3*) i *A. thaliana* (*AtFLA11* i *AtFLA12*) se eksprimiraju u velikoj meri u izdancima (MacMillan i sar., 2010), dok su neki *FLA* specifično eksprimirani u polenovim zrnima i cevima *A. thaliana* (Li i sar., 2010b), ksilemu *Z. elegans* (Dahiya i sar., 2006), tenzionom drvetu *P. tremula x P. alba* (Lafarguette i sar., 2004) i trihomama semena *G. hirsutum* (Huang i sar., 2008; 2013). Jun i Xiaoming (2012) su ispitali diferencijalnu ekspresiju *FLA* u različitim organima i tkivima *B. rapa* i utvrdili da je ekspresija nekih *FLA* detektovana samo u cvetovima, a ekspresija drugih *FLA* u izdancima i korenu. Gen *AtFLA3* koji se specifično eksprimira u polenovim zrnima i cevima *A. thaliana*, ima ulogu u razvoju mikrospora i depoziciji celuloze u okviru intine polenovih zrna (Li i saradnici, 2010b).

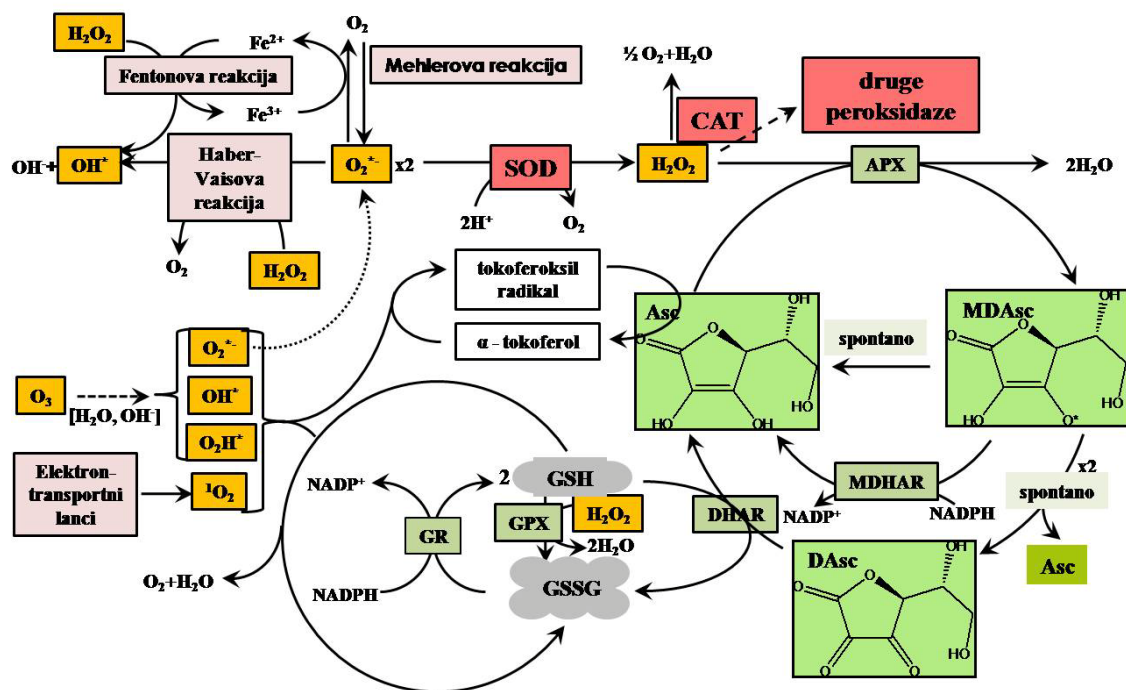
S obzirom na to da sadrže domene koji učestvuju u protein-protein interakcijama (FAS domen) i domene koji učestvuju u interakcijama između proteina i ugljenih hidrata (AGP domen, odnosno arabinogalaktanski lanci), FLA kod biljaka mogu imati ulogu u komunikaciji i adheziji ćelija (Jun i Xiaoming, 2012). Najveći broj podataka i potvrda o ulogama FLA kod biljaka dostupan je iz proučavanja na mutantima *A. thaliana*. FLA1 i FLA4 *A. thaliana* su primeri FLA sa dva FAS i dva AGP domena. FLA4/SOS5 sa dva FAS domena ima ulogu u održavanju odgovarajuće ekspanzije ćelija u uslovima povišene koncentracije soli. Značaj FAS domena za funkciju FLA proteina je pokazan pomoću *salt overly sensitive 5 (sos5)* mutanta *A. thaliana* koji ima tačkastu mutaciju u drugom FAS domenu *AtFLA4*, usled čega ćelije u vršnim delovima korenova imaju tanje ćelijske zidove i odlikuju se povećanom osetljivošću na povišenu koncentraciju soli (Shi i sar., 2003). Analize *fla1* mutanta *A. thaliana* koji pokazuje defekte u regeneraciji izdanaka ukazale su na ulogu *AtFLA1* gena u sticanju



kompetencije za razviće bočnih korenova i pupoljaka u kulturi *in vitro* (Johnson i sar., 2011). Analizama *fla11/fla12* mutanta *A. thaliana* utvrđene su uloge *AtFLA11* i *AtFLA12* gena, koji sadrže jedan FAS i dva AGP domena, u održavanju čvrstine i elastičnosti izdanaka tako što utiču na integritet ćelijskog zida, jer su takođe uključeni u depoziciju celuloze i formiranje sekundarnog ćelijskog zida (MacMillan i sar., 2010). Osim identifikovanja uloge 5 članova *FLA* familije *A. thaliana* (*AtFLA1*, *AtFLA3*, *AtFLA4*, *AtFLA11* i *AtFLA12*), opisana je i funkcija *FLA* kod *G. hirsutum*, *GhAGP4* (Li i sar., 2010a) i *GhFLA1* (Huang i sar., 2013) u inicijaciji i izduživanju trihoma koje prekrivaju seme pamuka, a predstavljaju izraštaje epidermalnih ćelija ovula.

#### 1.4. Oksidativni stres kod biljaka

Biljke su na svojim staništima često izložene abiotičkom stresu, kao što su na primer suša, povećana koncentracija soli, herbicidi, teški metali, visoka ili niska temperatura i jonizujuće zračenje, i biotičkom stresu, na primer napadima patogena. Ovi stresni uslovi imaju različite efekte na rasteње i razviće biljaka tako što indukuju mnoge metaboličke promene, među kojima je i povećana produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Narušavanjem ravnoteže između procesa produkcije ROS i aktivnosti antioksidativnog sistema biljaka pod dejstvom stresnih faktora dolazi do nagomilavanja ROS u ćelijama i pojave oksidativnog stresa (Gill i Tuteja, 2010). ROS nastaju u biljnim ćelijama tokom odvijanja normalnog ćelijskog metabolizma. Glavna mesta nastanka ROS su organele sa elektron-transportnim lancima – hloroplasti i mitohondrije – ali ROS se produkuju i u ćelijskoj membrani, peroksizomima, endoplazmatičnom retikulumu i apoplastu (Sharma i sar., 2012). Terminalni akceptor elektrona u procesu oksidativne fosforilacije je molekularni kiseonik. Nepotpunom redukcijom kiseonika, pomoću jednog, dva ili tri elektrona, dolazi do formiranja različitih ROS, kao što su slobodni radikali (superoksidni anjon radikal,  $O_2^{\cdot-}$ , hidroksil radikal,  $OH^{\cdot}$ , perhidroksil radikal,  $HO_2^{\cdot}$ ) i molekuli (vodoni-peroksid,  $H_2O_2$ , singlet kiseonik,  $^1O_2$  i ozon,  $O_3$ ). Superoksid anjon radikal nastaje putem Mehler-ove reakcije i može se metabolisati do vodoni-peroksida ( $H_2O_2$ ) aktivnošću superoksid dismutaze (SOD), a zatim se  $O_2^{\cdot-}$  i  $H_2O_2$  mogu konvertovati putem Haber-Weis-ove ili Fenton-ove reakcije do veoma toksičnih hidroksil radikala (**Slika 3**).



**Slika 3.** Najvažniji antioksidativni mehanizmi biljaka, u kojima centralno mesto zauzima ciklus askorbat-glutation. Enzimske i neenzimske antioksidativne komponente su prikazane crvenom i zelenom bojom, a ROS i procesi koji generišu ROS su označeni žutom i ružičastom bojom. GSH – redukovani glutation; GSSG – oksidovani glutation; GR – glutation reduktaza; GPX – glutation peroksidaza; Asc – askorbat; MDAsc – monodehidroaskorbat; DAsc – dehidroaskorbat; MDHAR – monodehidroaskorbat reduktaza; DHAR - dehidroaskorbat reduktaza; APX – askorbat peroksidaza; CAT – katalaza; SOD – superoksid dismutaza;  $O_2$  – molekularni kiseonik (triplet);  $^1O_2$  – singlet kiseonik;  $H_2O_2$  – vodonik-peroksid;  $O_2^{\bullet-}$  – superoksid radikal;  $OH^\bullet$  – hidroksil radikal;  $OH^-$  - hidroksil jon;  $O_2H^\bullet$  – perhidroksil radikal;  $O_3$  – ozon (modifikovano prema Simonović, 2011).

U normalnim, fiziološkim uslovima, ne dolazi do nagomilavanja ROS u toksičnim koncentracijama u biljnim ćelijama zahvaljujući delovanju antioksidativnog sistema koji ih efikasno razgrađuje. Tokom delovanja faktora koji izazivaju stres dolazi do prekomerne produkcije ROS u ćelijama koja dovodi do promena redoks sistema ćelije i utiče na glavne metaboličke puteve tako što izaziva promene u aktivnosti enzima, peroksidaciju nezasićenih masnih kiselina u membranskim lipidima, oštećenja

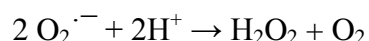
u strukturi DNK i drugih biomolekula (Cassells i Curry, 2001). Međutim, osim štetnog efekta koji mogu izazvati u visokim, toksičnim koncentracijama, ROS predstavljaju i signalne molekule. U odnosu na ostale ROS,  $H_2O_2$  je najstabilniji, a osim toga je i neutralan molekul čiji se transport kroz membrane odvija kroz akvaporine, zajedno sa vodom (Slesak i sar., 2007).  $H_2O_2$  ima ulogu signalnog molekula koji ima mogućnost indukcije ekspresije gena koji regulišu rastenje i razviće biljaka, adaptaciju na stresne uslove i programiranu ćelijsku smrt (Neill i sar., 2002; Apel i Hirt, 2004). Stresni faktori utiču na povećanje i intracelularne i ekstracelularne koncentracije  $H_2O_2$ . Smatra se da su ekstracelularne POX, aminooksidaze i NADPH-oksidaze, enzimi koji doprinose nastanku  $H_2O_2$  u apoplastu (Neill i sar., 2002). Uloga  $H_2O_2$  i drugih ROS u ECM je u odbrambenom odgovoru biljaka i u regulaciji rasteња ćelijskog zida, na primer u regulaciji sinteze komponenti ćelijskog zida (Passardi i sar., 2004; Cosio i Dunand, 2009).

Biljke poseduju antioksidativne odbrambene sisteme koji omogućavaju zaštitu ćelija od oksidativnih oštećenja u stresnim uslovima. Količina ROS u ćelijama je kontrolisana od strane različitih enzimskih i neenzimskih antioksidativnih odbrambenih sistema (**Slika 3**). Enzimski antioksidativni odbrambeni sistem uključuje katalaze (CAT), SOD, POX, askorbat peroksidaze (APX), dehidroaskorbat reduktazu (DHAR), monodehidroaskorbat reduktazu (MDHAR) i glutation reduktazu (GR). Neenzimski antioksidativni odbrambeni sistem uključuje askorbat, glutation, karotenoide, fenolna jedinjenja, prolin, glicin-betain, šećere i poliamine (Gill i Tuteja, 2010).

## 1.4.1. Antioksidativni enzimi biljaka

### 1.4.1.1. Superoksid dismutaze

Superoksid dismutaze (SOD, EC 1.15.1.1) predstavljaju prvu liniju odbrane ćelije od efekata ROS (Alcher i sar., 2002) i katalizuju reakciju dismutacije superoksid radikala do vodonik-peroksida i molekuskog kiseonika

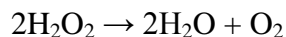


SOD pripadaju grupi metaloenzima, a klasifikacija SOD izoformi je izvršena upravo na osnovu prisustva metalnog kofaktora: gvožđa, bakar-cinka, mangana i nikla. Dve filogenetski nepovezane SOD familije, Cu/Zn-SOD sa jedne i strukturno slične Fe-SOD i Mn-SOD sa druge strane eliminišu superoksidne radikale u različitim delovima ćelije (Asensio i sar., 2011). Kambijalističke SOD su pronađene u grupi Fe/Mn-SOD i ove enzime karakteriše mogućnost da kao metalni kofaktor mogu koristiti ili mangan ili gvožđe. Usled negativnog naelektrisanja superoksidni radikal ne može prolaziti kroz ćelijske membrane, tako da  $\text{O}_2^{\cdot-}$  produkovan u organelama mora biti uklonjen pomoću SOD koje su lokalizovane u tim organelama. U hloroplastima se nalaze hloroplastna Cu/Zn-SOD i/ili Fe-SOD izoforma, dok se u mitohondrijama i peroksizomima nalazi Mn-SOD izoforma. U citoplazmi se nalazi citoplazmatična Cu/Zn-SOD izoforma i u ćelijskom zidu apoplastična Cu/Zn-SOD izoforma (Alcher i sar., 2002).

Aktivnost različitih izoformi SOD je regulisana razvojnim stimulusima, ali i sredinskim faktorima. Hloroplastne izoforme SOD su najčešće SOD u zelenim listovima, dok su u klijancima i etioliranim biljkama preovlađujuće citoplazmatične i mitohondrijalne izoforme (Bowler i sar., 1994). Različite izoforme SOD imaju i različitu osetljivost na inhibitore. FeSOD izoformu inhibira vodonik-peroksid, dok je otporna na cijanide. MnSOD izoforma ne može biti inhibirana vodonik-peroksidom i cijanidom, dok je Cu/ZnSOD osetljiva i na cijanide i vodonik-peroksid.

### 1.4.1.2. Katalaze

Katalaze (CAT, EC 1.11.1.6) su uglavnom lokalizovane u peroksizomima skoro svih aerobnih ćelija i katalizuju razgrađivanje vodonik-peroksida do vode i kiseonika. (Mhamdi i sar., 2010):



Osim u peroksizomima, CAT su prisutne i u glioksizomima, mitohondrijama, hloroplastima i u citosolu, gde nije utvrđeno prisustvo značajne CAT aktivnosti (Mhamdi i sar., 2010). Katalaze predstavljaju enzime vrlo velike aktivnosti i uklanjaju velike količine  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tako da jedan molekul CAT može redukovati šest miliona molekula  $\text{H}_2\text{O}_2$  do vode i kiseonika u minuti (Gill i Tuteja, 2010). Katalaze su tetramerni enzimi koji sadrže hem kao prostetičku grupu. Do sada su kod skrivenosemenica izolovana 3 gena (*CAT1*, *CAT2* i *CAT3*) koji kodiraju do 12 izoforni katalaza, čiji broj varira kod različitih vrsta biljaka (Mhamdi i sar., 2010).

### 1.4.1.3. Peroksidaze

Peroksidaze (POX, EC 1.11.1.7.) su glikoproteini čija je osnovna uloga redukcija  $\text{H}_2\text{O}_2$  pomoću različitih supstrata, pri čemu nastaje voda. Predstavljaju superfamiliju enzima koja je podeljena u tri klase na osnovu razlika u primarnoj strukturi, funkciji, supstratnoj specifičnosti i mehanizmima reakcije (Cosio i Dunand, 2009). Klasa I obuhvata intracelularne askorbat peroksidaze, bakterijske citohrom-c peroksidaze i katalaze-peroksidaze, dok klasu II čine isključivo ekstracelularne peroksidaze gljiva. Klasu III čine ekstracelularne peroksidaze (tzv. gvajakol peroksidaze), koje se nalaze u ćelijskom zidu ili su transportovane iz ćelija u okolni medijum i vakuolu i čija se aktivnost uglavnom i prati tokom razvojnih procesa.

Geni koji kodiraju ekstracelularne peroksidaze klase III pripadaju multigenkim familijama. Peroksidaze klase III su prisutne u velikom broju izoforni. Enzimi ove grupe imaju ulogu u različitim fiziološkim procesima, kao što su lignifikacija, suberinizacija, katabolizam auksina, rastenje ćelija, zaceljivanje povreda i odbrambeni mehanizmi tokom infekcije patogenima (Hiraga i sar., 2001). Osnovna uloga

peroksidaza je uklanjanje  $H_2O_2$  u klasičnom peroksidativnom ciklusu, što podrazumeva redukciju  $H_2O_2$  pomoću fenola, ligninskih prekursora, i raznih sekundarnih metabolita (Hiraga i sar., 2001). Osim toga, POX klase III su uključene i u proces nastanka  $H_2O_2$  i drugih ROS (Passardi i sar., 2004), učestvovanjem u hidroksilnom ciklusu gde dolazi do produkcije hidroksil radikala, kao i u oksidativnom ciklusu kada dolazi do produkcije  $H_2O_2$  pri oksidaciji NAD(P)H (Liszky i sar., 2003). Tokom rastenja i diferenciranja ćelijskog zida POX klase III imaju značajnu ulogu, koju ostvaruju tako što katalizuju obrazovanje veza između fenolnih derivata čime doprinose umrežavanju ćelijskog zida. Regulacijom produkcije hidroksil radikala, koji učestvuju u razgradnji polisaharida ćelijskog zida, POX klase III ostvaruju ulogu i u razmekšavanju i rastezanju ćelijskog zida na tokom procesa rastenja ćelija (Liszky i sar., 2003; Passardi i sar., 2004).

#### **1.4.2. Oksidativni stres kod biljaka tokom morfogeneze *in vitro***

Uslovi kulture *in vitro* predstavljaju kompleksnu kombinaciju stresnih faktora koji deluju na biljne ćelije (Zavattieri i sar., 2010). ROS se generišu usled povreda biljnih tkiva prilikom izolovanja eksplantata, kao i usled delovanja faktora koji izazivaju stres tokom gajenja eksplantata u kulturi, kao što su na primer, dejstvo egzogenih regulatora rastenja i niskih ili visokih koncentracija soli u hranljivoj podlozi i promene u fizičkom okruženju biljaka (na primer svetlosti različitih kvaliteta i inteziteta ili sastava atmosfere u posudama za gajenje). Biljne ćelije reaguju na fizičku povredu do koje dolazi prilikom izolovanja eksplantata radi uvođenja u kulturu *in vitro*, kao i prilikom svake subkulture, iniciranjem oksidativnog stresa (Yahraus i sar., 1995). Neke komponente hranljivih podloga, kao što su FeEDTA i joni metala stimulišu produkciju slobodnih radikala i peroksidaciju lipida (Somleva i sar., 2000). Proučavanja peroksidacije lipida u kulturi tkiva su pokazala da aldehidni produkti peroksidacije lipida inhibiraju deobu ćelija i formiranje somatskih embriona u suspenziji ćelija šargarepe (Adams i sar., 1999). Osim toga regulatori rastenja mogu izazvati stres, posebno povišene koncentracije i dugotrajna primena 2,4-D i sintetičkih citokinina (Ziv, 1991). Delovanjem stresnih faktora u kulturi *in vitro*, dolazi do nagomilavanja ROS u visokim koncentracijama koje izazivaju oštećenja DNK, proteina, lipida i membrana. Smatra se da oštećenja ovih molekula izazvana oksidativnim stresom u kulturi *in vitro*

značajno doprinose fiziološkoj, epigenetičkoj i genetičkoj varijabilnosti biljaka gajenih *in vitro* (Cassels and Curry, 2001). Promene koje se na genetičkom nivou javljaju u kulturi tkiva obuhvataju mutacije DNK (tačkaste mutacije, hromozomske aberacije, hromozomske rearanžmane i slično). Ove promene, zajedno sa epigenetskim promenama, mogu dovesti do gubitka regenerativnog potencijala (Lambe i sar., 1997) i somaklonalnog variranja (Jain i sar., 1998) Najčešći morfološki poremećaj koji se javlja u kulturi *in vitro* usled oksidativnog stresa izazvanog nagomilavanjem etilena je hiperhidričnost, za koju je između ostalih simptoma, karakterističan staklast izgled biljke (Tian i sar., 2014).

Smatra se da stresni uslovi imaju značajan efekat u indukciji SE (Zavattieri i sar., 2010; Karami i Saidi, 2010; Feher, 2015). Stresni faktori koji mogu indukovati formiranje somatskih embriona su brojni i uključuju osmotski stres, teške metale, visoke ili niske temperature, hipoksiju, mehaničke povrede i druge faktore (Zavattieri i sar., 2010). U odgovoru ćelija na ove stresne faktore dolazi do epigenetskih promena, odnosno do promena u metilaciji DNK, modifikaciji histona i remodeliranju hromatina kojima je omogućeno da dođe do reprogramiranja ekspresije gena i indukcije novog embriogenog razvojnog programa (Zavattieri i sar., 2010; Karami i Saidi, 2010; Feher, 2015).

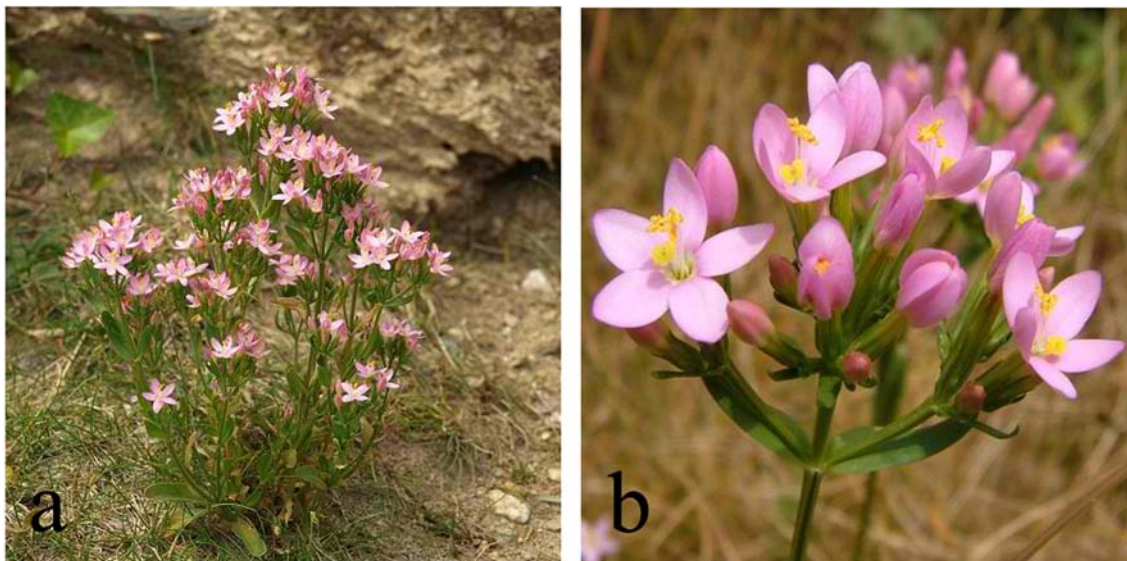
Regeneracija biljaka *in vitro* je kompleksan fenomen u čijem izučavanju je potrebno primeniti multidisciplinarni pristup. Istraživanja na biohemijskom nivou mogu doprineti otkrivanju uloge ROS i antioksidativnih enzima u procesu regeneracije biljaka. Akumulacija ROS može uticati na morfogenetski odgovor eksplantata gajenih u uslovima *in vitro* (Benson, 2000). Moguća veza između oksidativnog stresa i regeneracije biljaka u kulturi tkiva mogao bi biti  $H_2O_2$  (Libik i sar., 2005). Ovi autori su ustanovili da su se rizogeni i embriogeni kalus razlikovali u količini  $H_2O_2$ , na osnovu čega predlažu moguću ulogu  $H_2O_2$  u indukciji različitih morfogenetskih puteva. Praćenjem endogenih koncentracija  $H_2O_2$  u kalusu tokom morfogeneze *in vitro* utvrđena je korelacija između povišenih nivoa  $H_2O_2$  i indukcije SE kod *Lycium barbarum* (Kairong i sar., 1999) i banane (*Musa* AAA cv, Yueyoukang 1) (Ma i sar., 2012), kao i indukcije organogeneze izdanaka kod jagode (Tian i sar., 2003). Povećana koncentracija  $H_2O_2$  u apoplastu je bila od ključnog značaja za odvijanje ćelijskih deoba u kulturi protoplasta duvana (*Nicotiana tabacum*) (de Marco and Roubelakis-Angelakis, 1996).

Dodavanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u hranjivu podlogu stimulirana je SE kod *L. barbarum* (Kairong i sar., 1999) i organogeneza u kalusu jagode (Tian i sar., 2003).

### 1.5. Opšte karakteristike kičice (*Centaurium erythraea* Rafn.)

Vrste roda *Centaurium* pripadaju porodici *Gentianaceae* (porodici lincura), redu *Gentianales*. Pripadnici ove porodice su jednogodišnje ili višegodišnje, većinom zeljaste biljke, ređe polužbunaste ili žbunaste. Porodica *Gentianaceae* obuhvata veliki broj vrsta sa interesantnim fitohemijskim osobinama, koje su u širokoj upotrebi u tradicionalnoj medicini. Za vrste koje pripadaju ovoj porodici karakteristično je prisustvo iridoidnih glukozida (uglavnom sekoiridoidnih glukozida), ksantona, mangiferina i C-glukoflavona (Jensen i Schripsema, 2002).

Naziv roda *Centaurim* potiče od grčke reči *kentayrion*=kentaur, jer se otkriće lekovitosti biljke pripisivalo kentauru Hironu iz grčke mitologije. Po drugom objašnjenju, naziv potiče od latinskih reči: *centum*=stotina i *aureum*=zlatnik, zbog velike lekovite vrednosti (Jovanović-Dunjić, 1973). U okviru ovog roda nalazi se oko 20 vrsta (Mansion, 2004). U flori Srbije su zastupljene 4 vrste: *C. erythraea*, *C. uliginosum*, *C. tenuiflorum* i *C. pulchellum* (Jovanović-Dunjić, 1973). Vrste roda *Centaurium* su bogat izvor sekoiridoidnih glukozida i ksantona (Van der Sluis, 1985; Jensen i Schripsema, 2002; Janković i sar., 2002).



Slika 4. *Centaurium erythraea* Rafn. na prirodnom staništu: a) izgled biljke; b) izgled cvasti ([http://www.aphotoflora.com/d\\_centaurium\\_erythraea\\_common\\_centaury.html](http://www.aphotoflora.com/d_centaurium_erythraea_common_centaury.html))



Kičica (*Centaurium erythraea* Rafn.; sinonimi *C. umbellatum* ili *C. minus*) je jednogodišnja ili dvogodišnja zeljasta biljka, visoka 10-50 cm (**Slika 4a**). Stablo kičice je uspravno, četvorougono, u gornjem delu granato. Listovi na stablu su naspramno raspoređeni, sedeći, duguljasto jajasti do lancetasto eliptični, dok su prizemni listovi jajasto eliptičnog oblika organizovani u rozetu. Cvetovi su u račvastoj, štitastogrozdastoj cvasti (**Slika 4b**), koja je ravna po gornjoj površini, jer su cvetovi uvek na istoj visini. Plod je usko cilindrična čaura, 7 - 8 mm duga, poludvoaka. Seme je sitno, sa mrežasto-žiličastom opnom. Rasprostranjena je u skoro čitavoj Evropi (osim severa), na Kavkazu, u Persiji i severnoj Africi, dok je u severnoj Americi alohtona vrsta. Kičica se može naći na šumskim staništima, svetlim šikarama, po ivicama puteva i njiva, na golim padinama, na nadmorskoj visini do 1400 m. Živi na krečnim, suvim zemljištima, ali i na ilovastim, peščanim i močvarnim.

Kičica je biljka širokog lekovitog spektra delovanja i zabeležena je u mnogim farmakopejama (European Pharmacopoeia, 2010). Nadzemni delovi kičice predstavljaju biljnu drogu „*Centaurii herba*“ i koriste za pripremu gorkih tonika, čajeva i tinktura kao tradicionalnih lekova u lečenju bolesti gastrointestinalnog trakta (Skrzypczak i sar., 1993). Osim toga, koristi se kao lek za jačanje organizma, za stimulisanje apetita i lučenja želudačnih i crevnih sokova, protiv malokrvnosti, protiv upala i povišene temperature. Lekovita svojstva kičice se pripisuju prisustvu farmakološki aktivnih supstanci, kao što su gorki sekoiridoidni glukozidi genciopikrin, svercijamarin i sverozid (Van der Sluis, 1983). Ovi sekundarni metaboliti imaju antifungalno, antibakterijsko i hepatoprotektivno dejstvo (Kumarasamy i sar., 2003). Kičica sadrži i druge sekundarne metabolite, kao što su ksantoni, eustomin i dimetileustomin (Van der Sluis, 1985; Valentao i sar., 2002).

Pored toga što ima širok areal rasprostranjenja, kičica danas predstavlja ugroženu vrstu na svojim staništima usled nekontrolisane eksploatacije.

### 1.5.1. Regeneracija kičice *in vitro*

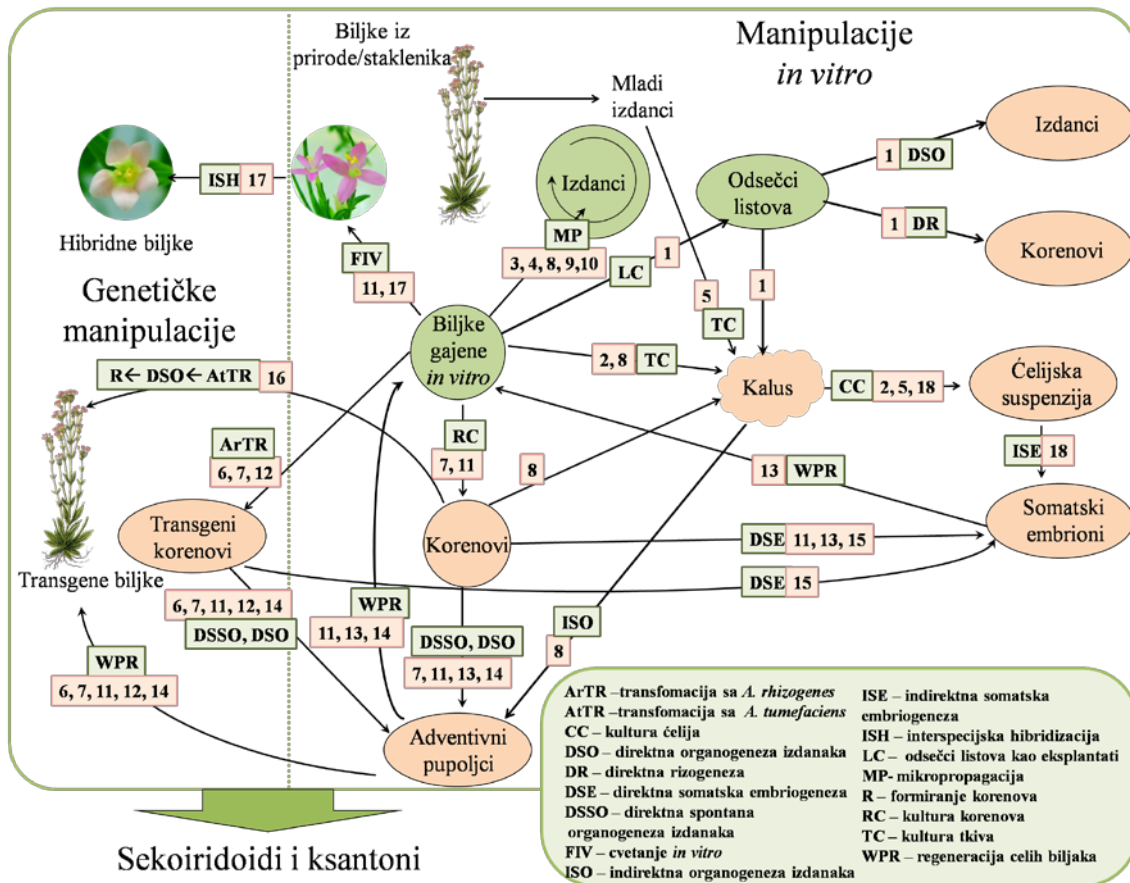
Prvi podaci iz literature o regeneraciji vrste *C. erythraea* u kulturi *in vitro* datiraju iz 1983. godine, kada su Čellarová i saradnici (1983) postigli indukciju kalusogeneze na LS (Linsmaier i Skoog, 1965) hranljivoj podlozi obogaćenoj auksinima (NAA i 2,4 D). Takođe su indukovali organogenezu pupoljaka iz eksplantata listova, koje su izolovali sa biljaka različite starosti, i gajili na LS hranljivoj podlozi koja je sadržala BAP u različitim koncentracijama. Kao početni eksplantati za indukciju morfogeneze na početku istraživanja procesa regeneracije kičice *in vitro* korišćeni su segmenti listova, a takođe je ispitivan uticaj hranljive podloge i regulatora rasteanja. Organogeneza iz odsečaka listova kičice indukovana je na LS ili MS (Murashige i Skoog, 1962) hranljivim podlogama koje su bile obogaćene uglavnom kombinacijom citokinina i auksina. Barešova i saradnici (1985) su indukovali organogenezu pupoljaka i korenova u prisustvu IAA i KIN na MS hranljivoj podlozi iz odsečaka listova kičice (**Slika 5**), dok su Laureova i saradnici (1986) indukciju organogeneze postigli na LS hranljivoj podlozi u koju su dodati 2,4 D ili BAP. Osim listova, Piatzak i Wysokinska (2003) su ispitivale i morfogenetski potencijal drugih eksplantata kičice (hipokotila, kotiledona i korenova) na MS hranljivoj podlozi obogaćenoj sa IAA i BAP. U ovim istraživanjima koren i list kičice su pokazali veliku sposobnost regeneracije pupoljaka. U kulturi korenova kičice direktna regeneracija pupoljaka je postignuta na  $\frac{1}{2}$ MS hranljivoj podlozi (Subotić i sar., 2003/4). Visok morfogenetski odgovor dobijen je u kulturi korenova na čvrstoj  $\frac{1}{2}$ MS hranljivoj podlozi u koju su dodati različiti auksini IAA, IBA, NAA, 2,4-D i 2,3,5-trijodbenzoeva kiselina u različitim koncentracijama, na svetlosti i u mraku (Subotić i sar., 2006). Takođe je ispitivan uticaj različitih citokinina (KIN; BAP;  $N^6$ -2-izopentenil adenin ; TDZ; CPPU; zeatin ) na indukciju morfogeneze u kulturi korenova kičice (Subotić i sar., 2009a). Prvi put je ispitan efekat sintetičkih citokinina, derivata feniluree (TDZ i CPPU), na proces regeneracije kod kičice i utvrđeno je da su ovi citokinini bili efikasniji u indukciji adventivnih pupoljaka u odnosu na adeninske citokinine.

Proces SE kod vrste *C. erythraea* je prvi put indukovano u suspenziji ćelija na LS hranljivoj podlozi obogaćenoj sa IAA i KIN, dok kombinacija 2,4-D i KIN nije bila pogodna za indukciju ovog procesa (Barešova i Kaminek, 1984). Giberelna kiselina

(GA<sub>3</sub>) ima inhibitorni efekat na proces SE u kulturi korenova kičice (Subotić i sar., 2009c). Histološka istraživanja su pokazala da se proces organogeneze pupoljaka može odvijati paralelno sa procesom SE u kulturi korenova *C. erythraea* (Subotić i Grubišić, 2007). U kulturi korenova kičice *in vitro* se javlja spontana regeneracija putem organogeneze i SE, na čvrstoj ½MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja (Subotić i sar., 2003/4; Subotić i sar., 2006; Subotić i Grubišić, 2007; Subotić i sar., 2009b). Regeneracija biljaka kičice u kulturi *in vitro* postignuta je i putem mikropropagacije, odnosno razmnožavanjem apikalnih i aksilarnih pupoljaka koji su potom ožiljavani (Barešova 1988; Vagnerova 1992; Piatzak i Wysokinska, 2003).

Osim visoke regenerativne sposobnosti ispoljene u uslovima *in vitro*, i druge odlike ove vrste doprinose tome da je kičica pogodna za proučavanja u kulturi *in vitro*. Ceo ciklus razvića, od semena do semena, kod ove vrste je moguće ostvariti u kulturi *in vitro*, što je omogućilo interspecijsku hibridizaciju sa još tri vrste ovog roda i dobijanje interspecijskih hibrida u kulturi (Banjanac i sar., 2014). Takođe su opisane i uspešne genetičke transformacije ove vrste pomoću *A. rhizogenes* (Subotić i sar., 2003/4; Piatzak i sar., 2006) i *A. tumefaciens* (Trifunović i sar., 2013). Produkcija sekundarnih metabolita kičice, sekoiridoida i ksantona, u kulturi *in vitro* je praćena u ćelijskim suspenzijama (Meravy, 1987; Beerhues i Berger, 1994), u regenerisanim biljkama gajenim u tečnoj kulturi (Piatzak i sar., 2005a; b) i u kulturi korenova (Subotić i sar., 2006). Povećana produkcija sekundarnih metabolita je detektovana u kulturi transformisanih korenova kičice u odnosu na netransformisane korenove (Janković i sar., 2002; Piatzak i sar., 2006; Subotić i sar., 2009b).

Navedena istraživanja u kulturi *in vitro* (**Slika 5**) su ukazala na to da se kičica odlikuje izuzetno visokim kapacitetom za regeneraciju. Regeneraciju celih biljaka kičice je moguće postići različitim morfogenetskim procesima, što, isto kao i uspešni protokoli za različite *in vitro* i genetičke manipulacije (**Slika 5**), ukazuje na to da je kičica pogodna za laboratorijska proučavanja i može poslužiti kao model-sistem u razvojnoj fiziologiji, za istraživanje molekularnih mehanizama procesa morfogeneze *in vitro*, posebno procesa sticanja embriogenog potencijala.



**Slika 5.** Prikaz dosadašnjih istraživanja procesa *in vitro* regeneracije i genetičkih manipulacija vrste *C. erythraea*. Brojevima su označene odgovarajuće reference. 1 - Barešová i sar., 1985; 2 - Meravý, 1987; 3 - Barešová, 1988; 4 - Vágnerova, 1992; 5 - Beerhues i Berger, 1994; 6 - Janković i sar., 2002; 7 - Subotić i sar., 2003/4; 8 - Piatczak i Wysokinska, 2003; 9 - Piatczak i sar., 2005a; 10 - Piatczak i sar., 2005b; 11 - Subotić i sar., 2006; 12 - Piatczak i sar., 2006; 13 - Subotić i Grubišić, 2007; 14 - Subotić i sar., 2009b; 15 - Subotić i sar., 2009a; 16 - Trifunović i sar., 2013; 17 - Banjanac i sar., 2014; 18 - Barešová i Kaminek, 1984.

## 2. CILJRADA

Osnovni zadatak ove doktorske disertacije je proučavanje pojedinih biohemijskih i molekularnih aspekata *in vitro* morfogeneze kičice (*Centaureum erythraea* Rafn.) u cilju rasvetljavanja razvojne plastičnosti ove biljne vrste koja se ispoljava u uslovima *in vitro* kulture. Radi realizacije ovog istraživačkog zadatka, definisani su sledeći ciljevi:

1. Ispitivanje optimalnih uslova za indukciju procesa *in vitro* morfogeneze iz odsečaka listova kičice, u cilju komparativne analize ovih razvojnih procesa na biohemijskom i molekularnom nivou.
2. Utvrđivanje uloge i značaja antioksidativnih enzima tokom procesa *in vitro* morfogeneze kičice na osnovu određivanja aktivnosti i profila izoformi antioksidativnih enzima, superoksid dismutaza, katalaza i peroksidaza.
3. Ispitivanje uloge arabinogalaktanskih proteina u procesu morfogeneze *in vitro* kod kičice.
4. Identifikacija AGP gena u rekonstruisanom transkriptomu i sekvenciranje ovih gena.
5. Analiza ekspresije *AGP* gena kičice tokom procesa morfogeneze *in vitro* radi utvrđivanja njihove uloge u različitim morfogenetskim procesima.

### **3. MATERIALI METODE**

#### **3.1. Biljni materijal**

Kao početni materijal za eksperimente korišćena su komercijalna semena *Centaurea erythraea* Rafn. (Jelitto Staudensamen GmbH, Schwarmstedt, Germany).

#### **3.2. Uspostavljanje *in vitro* kulture klijanaca *C. erythraea* Rafn.**

Isključivanjem semena kičice uspostavljene su *in vitro* kulture. Semena su površinski sterilisana u aseptičnim uslovima, rastvorom komercijalnog preparata natrijum hipohlorita, sa 4% aktivnog hlora (NaOCl) u trajanju od 10 min. Potom su ispirana nekoliko puta sterilnom dejonizovanom vodom. Semena su klijala u Petri-kutijama na ½ BM hranljivoj podlozi. Klijanci su se razvili iz proklijalih semena. Klijanci stari tri nedelje dalje su gajeni na istoj hranljivoj podlozi radi uspostavljanja *in vitro* kulture kičice.

U svim eksperimentima su korišćeni odsecci listova kao eksplantati, koji su izolovani sa *in vitro* gajenih biljaka. Sa *in vitro* gajenih biljaka su izolovana dva para listova sa nodusa najbližih apeksu. Iz listova su isecani poprečni odsecci dužine 5-7 mm i postavljeni su svojom abaksijalnom stranom na različite hranljive podloge za ispitivanje morfogeneze i gajeni na svetlosti ili u mraku.

#### **3.3. Hranljive podloge**

Osnovna podloga (BM) korišćena u ovom radu je zapravo MS podloga po Murashige i Skoog-u (1962) bez dodatih regulatora rastežja. Osim MS mineralnog rastvora i vitamina (**Tabela 2**), BM hranljiva podloga je sadržala i saharozu kao izvor ugljenika u koncentraciji 30 g/l, mio-inositol (Sigma) 100 mg/l i agar (Torlak, Beograd) 7 g/l. pH vrednost hranljive podloge je pre sterilizacije podešavana pomoću 1N NaOH i/ili 1N HCl na 5,8.

**Tabela 2.** Sastav makro- i mikro-mineralnih soli, gvožđa i vitamina u hranljivoj MS podlozi (Murashige i Skoog, 1962)

<b>Makro mineralne soli MS</b>	<b>mg/l podloge</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Mikro mineralne soli MS</b>	<b>mg/l podloge</b>
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	22,300
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,600
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,200
KJ	0,830
NaMoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,250
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Kompleks gvožđa</b>	<b>mg/l podloge</b>
NaEDTA x 2H <sub>2</sub> O	27,8
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	37,2
<b>Vitamini</b>	<b>mg/l podloge</b>
vitamin B <sub>1</sub>	0,1
vitamin B <sub>6</sub>	0,5
nikotinska kiselina	0,5
glicin	2,0

Za isključivanje semena i gajenje biljaka kičice *in vitro* korišćena je ½ BM hranljiva podloga, koja je sadržala makro i mikro mineralne soli po Murashige i Skoog-u (1962) upola razblaženog sastava.

### 3.3.1. Hranljive podloge za ispitivanje morfogeneze *in vitro* kičice

Hranljive podloge koje su korišćene za ispitivanje morfogeneze *in vitro* su prikazane u **Tabeli 3.**

**Tabela 3.** Hranljive podloge korišćene za ispitivanje morfogeneze *in vitro*

<b>HRANLJIVE PODLOGE</b>	
BM (MS bez dodatih regulatora rastenja)	BM
BM+0,2 mg/l 2,4-D+ 0,01 mg/l CPPU	BM1
BM+0,2 mg/l 2,4-D+ 0,05 mg/l CPPU	BM2
BM+0,2 mg/l 2,4-D+ 0,1 mg/l CPPU	BM3
BM+0,2 mg/l 2,4-D+ 0,15 mg/l CPPU	BM4
BM +0,2 mg/l 2,4-D+ 0,2 mg/l CPPU	BM5
BM+0,2 mg/l 2,4-D+ 0,5 mg/l CPPU	BM6

### 3.3.2. Hranljive podloge za ispitivanje efekata $\beta$ GlcY na proces morfogeneze *in vitro*

Hranljive podloge za ispitivanje efekata  $\beta$ GlcY na proces morfogeneze *in vitro* su prikazane u Tabeli 4.

**Tabela 4.** Hranljive podloge korišćene za ispitivanje efekta  $\beta$ GlcY na proces morfogeneze *in vitro*

HRANLJIVE PODLOGE	
BM+5 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM5
BM+15 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM15
BM+25 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM25
BM+50 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM50
BM+75 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM75
BM+100 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM100
BM+150 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM150
BM+0,2 mg/l 2,4-D+ 0,2 mg/l CPPU+5 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM5Y5
BM+0,2 mg/l 2,4-D+ 0,2 mg/l CPPU+15 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM5Y15
BM+0,2 mg/l 2,4-D+ 0,2 mg/l CPPU+25 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM5Y25
BM+0,2 mg/l 2,4-D+ 0,2 mg/l CPPU+50 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM5Y50
BM+0,2 mg/l 2,4-D+ 0,2 mg/l CPPU+75 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM5Y75
BM+0,2 mg/l 2,4-D+ 0,2 mg/l CPPU+100 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM5Y100
BM+0,2 mg/l 2,4-D+ 0,2 mg/l CPPU+150 $\mu$ M $\beta$ GlcY	BM5Y150

### 3.4. Uslovi gajenja *in vitro* kultura

*In vitro* kulture gajene su u klimatizovanoj prostoriji za gajenje, pri temperaturi vazduha  $25 \pm 2$  °C, u uslovima dugog dana (16 h svetlosti i 8 h mraka) ili u mraku. Kao izvor svetlosti korišćena je bela svetlost fluorescentnih lampi ("Tesla Pančevo"), jačine 65W, 4500K. Gustina svetlosnog fluksa, izmerena instrumentom LI-1400 DataLogger sa LI-190SA quantum senzorom (LI-COR Biosciences, Bad Homburg Germany) iznosila je  $47 \mu\text{mol}^1\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .



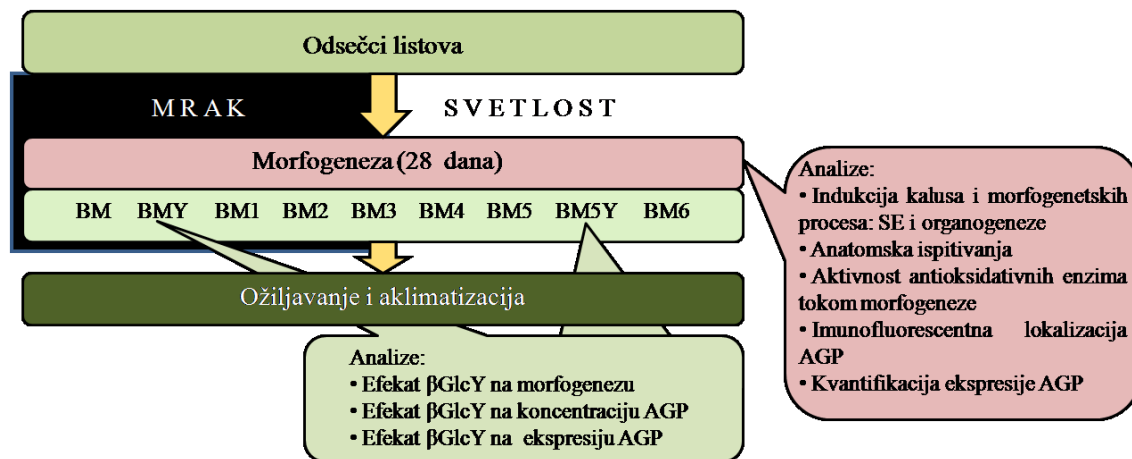
### 3.5. Ispitivanje efekata regulatora rastenja, uslova osvetljenja i $\beta$ GlcY na proces morfogeneze *in vitro*

#### 3.5.1. Ispitivanje efekata regulatora rastenja i uslova osvetljenja na proces morfogeneze *in vitro*

U cilju ispitivanja efekata regulatora rastenja, *N*-fenil-*N'*-(2-hloro-4-piridil) uree (CPPU) i dihlorfenoksisirćetne kiseline (2,4 D), i uslova osvetljenja na proces morfogeneze *in vitro*, odsecci listova 5-7 mm dužine su postavljeni u Petri-kutije na BM hranljivu podlogu obogaćenu sa 2,4 D (0,2 mg/l) i CPPU (0,01; 0,05; 0,1;0,15; 0,2 ili 0,5 mg/l) (Tabela 3), a zatim gajeni u uslovima dugog dana (16 h svetlosti i 8 h mraka) ili u mraku, tokom 28 dana (Slika 6). Na kraju eksperimenta određivani su sledeći parametri:

- procenat eksplantata sa kalusom
- procenat eksplantata sa embriogenim kalusom
- procenat eksplantata sa adventivnim pupoljcima

Eksperimenti su ponovljeni tri puta. Svaka eksperimentalna i kontrolna grupa se sastojala od 20 eksplantata.



Slika 6. Shema eksperimenata; BM-osnovna hranljiva podloga; BM1, BM2, BM3, BM4, BM5, BM6- hranljive podloge sa regulatorima rastenja; BM5, BM5Y-hranljive podloge za ispitivanje efekata  $\beta$ GlcY na proces morfogeneze *in vitro*.

### **3.5.2. Ispitivanje efekata $\beta$ GlcY na proces morfogeneze *in vitro***

Radi ispitivanja efekta  $\beta$ GlcY na proces morfogeneze *in vitro* i sadržaj arabinogalaktanskih proteina, u BM hranljivu podlogu je dodavan ovaj reagens u koncentraciji od 0, 5, 15, 25, 20, 75, 100 ili 150  $\mu$ M. Korišćen je  $\beta$ GlcY sintetisan iz prekursora, p-aminofenil- $\beta$ -D-glukoze i fluoroglucinola uz prisustvo NaNO<sub>2</sub>, prema proceduri Yariv i saradnici, (1962). Eksplantati su gajeni u standardnim uslovima, na svetlosti ili u mraku, tokom 28 dana (**Slika 6**). Na kraju eksperimenta određivani su sledeći parametri:

- a. broj somatskih embriona po eksplantatu
- b. broj pupoljaka po eksplantatu

Eksperimenti su ponovljeni tri puta. Svaka eksperimentalna i kontrolna grupa se sastojala od najmanje 10 eksplantata.

### **3.6. Anatomsko istraživanje morfogeneze *in vitro***

U ovom radu korišćene su klasične anatomske metode (Jensen, 1962) za proučavanje razvojnih stupnjeva somatskih embriona i adventivnih pupoljaka.

Struktura razvojnih stadijuma somatskih embriona i adventivnih pupoljaka je praćena kod kultura koje su gajene na BM, BM1 i BM6 hranljivim podlogama, na svetlosti ili u mraku. Odsecci listova su fiksirani u različitim vremenskim intervalima od početka eksperimenta, tj. nakon 3, 5, 7, 10, 15, 20 i 28 dana. Kao kontrola korišćeni su sveže izolovani odsecci listova, koji nisu gajeni na hranljivim podlogama.

#### **3.6.1. Fiksacija biljnog materijala i pravljenje trajnih preparata**

Odsecci listova su fiksirani u FAA fiksativu (10 ml 37% formaldehida i 5 ml glacijalne sirćetne kiseline rastvoreni u 85 ml 70% etanola) na 4 °C. Posle procesa fiksacije materijal je ispiran. Kako je biljni materijal fiksiran u fiksativu koji u svom sastavu ima apsolutni etanol, uzorci su dehidrirani u gradijentu vodenih rastvora etanola u kojima se udeo vode postepeno smanjivao (50%, 70%, 96%, 100%). Posle dehidratacije tkivo je tretirano smešom apsolutnog etanola i ksilola (1:1) i ksilolom.

Materijal je utopljen u paraplast (Histowax, Histolab, Sweden) u trajanju od dva dana na 58 °C. Nakon tog postupka usledilo je kalupljenje biljnog materijala. Oblikovani parafinski blokovi sečeni su na Reichertov-om rotacionom mikrotomu. Preseci, debljine 7µm su lepljeni na predmetne pločice. Osnovni uslov da bi se tkivo obojilo jeste da bude oslobođeno od parafina, što je postignuto tretmanom tkiva sa ksilolom, dva puta po 10 minuta. Rehidratacija preparata je postignuta sprovođenjem preseka kroz seriju vodenih rastvora etanola opadajućih koncentracija (100%, 96%, 70%). Nakon deparafinizacije i rehidratacije preparati su bojani rastvorom hematoksilina. Rastvor hematoksilina se priprema rastvaranjem 1 g boje u 10 ml 96% etanola, a zatim se doda 90 ml destilovane vode. Boja "sazreva" 2-3 nedelje. Pre upotrebe boja je profiltrirana. Iz boje preparati su prenošeni u destilovanu vodu, pa su ispirani u tekućoj vodi i na kraju dehidrirani sprovođenjem kroz seriju vodenih rastvora etanola rastućih koncentracija (70%, 96%, 100%). Preparati su prosvetljeni pomoću ksilola. Preko preparata koji je izvađen iz ksilola nanosi se kap kanada balzama i preseci se pokrivaju pokrovnim staklom. Trajni preparati su fotografisani na Litz DMRB svetlosnom mikroskopu (Leica, Wetzlar, Germany).

### **3.7. Biohemijska istraživanja morfogeneze *in vitro***

Na biohemijskom nivou ispitivana je aktivnost antioksidativnih enzima (superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i peroksidaza (POX)), kao i koncentracija i profil arabinogalaktanskih proteina tokom morfogeneze *in vitro*.

#### **3.7.1. Analiza aktivnosti antioksidativnih enzima tokom morfogeneze *in vitro***

Aktivnost antioksidativnih enzima je ispitivana tokom morfogeneze *in vitro* kod odsečaka listova gajenih na svetlosti ili u mraku na BM, BM1 ili BM6 hranljivim podlogama. Promena aktivnosti antioksidativnih enzima praćena je posle 7, 14, 21 i 28 dana. Aktivnost enzima je određivana spektrofotometrijski i razdvajanjem izoenzima superoksid dismutaza, katalaza i peroksidaza u poliakrilamidnom gelu nenedenaturišućom elektroforezom ("*Native PAGE*").

### 3.7.1.1. Izolacija i kvantifikacija ukupnih proteina

Ukupni rastvorljivi proteini za enzimske testove izolovani su iz lisnih odsečaka prosečne mase 1 g, koji su sprášeni u tečnom azotu. U uzorke je dodato po 2 ml pufera za ekstrakciju proteina. Pufer za ekstrakciju proteina (PEB) je sadržao: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 30% glicerol, 1,5% polivinilpolipirolidon (PVPP), 10 mM DTT i 1 mM fenilmetansulfonilfluorid (PMSF). Nakon homogenizacije uzorci su prenošeni u Ependorf-epruvete koje su stajale na ledu i centrifugirani su na 12000 x g u trajanju od 15 min na 4 °C. Gornja faza je potom profiltrirana kroz nastavke od 1 ml napunjene gazom i prebačena u nove Ependorf-epruvete na ledu. Supernatant predstavlja neprerađeni "crude" ekstrakt i sadrži rastvorljive ćelijske proteine. Koncentracija ukupnih proteina u supernatantu određena je spektrofotometrijski (Bradford, 1976) pri talasnoj dužini od 595 nm uz korišćenje BSA ("*Bovine Serum Albumin*") kao proteinskog standarda.

### 3.7.1.2. Nativna elektroforeza ("*Native PAGE*")

Za determinaciju izoformi enzima nativnom elektroforezom ("*Native PAGE*") korišćen je 7% poliakrilamidni gel za razdvajanje ("*separating gel*") i 5% poliakrilamidni gel za koncentrovanje ("*stacking gel*"). Sastav 7% gela za razdvajanje (10 ml) je bio: 4,8 ml vode; 2,8 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 2,35 ml mešavine 30% akrilamida i 0,8% bisakrilamida; 15 µl TEMED-a i 30 µl APS-a, dok je za 4,5 ml 5% gela za koncentrovanje bilo potrebno: 2,83 ml vode; 0,875 ml 1M Tris-HCl (pH 8,0); 0,75 ml mešavine 30% akrilamida i 0,8% bisakrilamida; 7,5 µl TEMED-a i 15 µl APS-a). Debljina gelova je bila 1,5 mm a veličina 16 x 16 cm. Za razdvajanje proteina korišćen je sistem za vertikalnu elektroforezu SE 600 Rubi, Amersham Biosciences, USA. Prilikom elektroforeze korišćen je pufer koji je sadržao 25 mM Tris-HCl i 192 mM glicina, pH 8,3. Na gelove su nanošeni uzorci proteina u sledećim količinama: za analizu SOD 60 µg, za CAT 5 µg i za POX 60 µg ukupnih proteina, koji su prethodno mešani su sa "*Loading buffer*"-om (za 10 ml pufera: 3 ml glicerola, 0,25% bromfenol plavo, 2,4 ml 1M Tris-HCl pH 6,8, 10 µl 1 M DTT i 4,59 ml vode). Aktivnost svake vrste enzima određivana je 3 puta.

### 3.7.1.3. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaza

Aktivnost SOD je određivana elektroforetski i spektrofotometrijski. Izoenzimske forme SOD razdvajane su po metodi Beauchamp-a i Fridovich-a (1971), elektroforezom u trajanju od 1 h na 150 V i 5 h na 200V, na 4 °C, sve dok boja nije došla do dna gela. Nakon elektroforeze gelovi su ispirani vodom i inkubirani 30 min u mraku, u reagensu za enzimski test koji je sadržao 250 mM EDTA, 0,098 mM nitrotetrazolijum hlorid (NBT), 0,03 M riboflavin i 2 ml N,N,N',N'-tetrametiletan-1,2-diamin (TEMED) u kalijum fosfatnom puferu (pH 7,8). Gelovi su zatim ispirani vodom i osvetljavani svetlošću neonske lampe do pojave purpurno-ljubičaste boje. Bojenje gelova za utvrđivanje SOD aktivnosti se zasniva na NBT/riboflavin reakciji kada dolazi do formiranja formazana purpurno-ljubičaste boje. Na mestima aktivnosti SOD gel je ostajao neobojen jer SOD inhibira formiranje formazana. Različite izoforme superoksid dismutaze su identifikovane tako što su gelovi sa identičnim uzorcima pre bojenja inkubirani u 100 mM kalijum fosfatnom puferu, pH 7,8 koji je korišćen kao kontrola ili u puferu koji je sadržao inhibitore izoformi superoksid dismutaze 1 mM KCN ili 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u trajanju od 30 min. Vodonik-peroksid inhibira CuZn-SOD i Fe-SOD, kalijum cijanid inhibira CuZn-SOD, dok su u kalijum fosfatnom puferu aktivne sve izoforme SOD.

Aktivnost ukupnih superoksid dismutaza je određivana po metodi Beyer-a i Fridovich-a (1987). Reakciona smeša (1 ml) se sastojala od: 775 – 800 µl 100 mM K–P pufera (pH 7,8); 50 µl 0,1 mM EDTA; 50 µl 3,0 mM L–metionina; 50 µl 5,0 mM NBT, 50 µl 2,0 mM riboflavina i 0 – 25 µl uzorka. Za svaki uzorak pripremljeno je 6 razblaženja. Reakciona smeša je izlagana svetlosti neonske lampe, 15 min na temperaturi od 20 °C. SOD aktivnost je određivana na osnovu kapaciteta ekstrakta da inhibira fotohemijску redukciju NBT-a do formazana. Apsorbanca na 540 nm je izmerena pomoću aparata *ELISA Micro Plate Reader* (LKB 5060–006). Kontrolna reakciona smeša nije sadržala uzorak proteina. Jedna SOD jedinica (U) je definisana kao količina enzima neophodna kao količina enzima neophodna da inhibira 50% NBT fotoredukcije u poređenju sa kontrolnom smešom i izražava se u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvorenih proteina (U/mg).

Sva merenja za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksida dismutaza su rađena u 3 ponavljanja.

#### 3.7.1.4. Određivanje aktivnosti katalaza

Izoforme katalaza su razdvojene prema metodi Woodbury-a i saradnika (1971), elektroforezom na 150 V u trajanju od 1 h, a zatim na 200 V tokom 3 h. Nakon elektroforeze gelovi su ispirani dejonizovanom vodom, zatim su inkubirani u 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 minuta. Posle toga ispirani su dejonizovanom vodom i inkubirani su u 2% rastvoru K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> tokom 30 s, zatim je u taj rastvor dodata ista zapremina 2% rastvora FeCl<sub>3</sub> pri čemu nastaje jedinjenje KFe<sup>III</sup>(Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>), koje boji gel plavo-zelenom bojom. Na mestima na kojima je prisutna katalaza, koja katalizuje degradaciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dolazi do obezbojavanja nakon nekoliko minuta. Kada su se trake najbolje uočavale reakcija je zaustavljena ispiranjem gelova u vodi.

Aktivnost katalaza određivana je spektrofotometrijski, praćenjem kinetike nestajanja vodonik peroksida ( $\epsilon_{240}=0.0436 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), prema metodi Aebi-a (1984). Reakciona smeša je sadržala 0,5 ml reagensa 1 (50 mM K–Na–fosfatni pufer pH 7 i 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a apsorbance reagensa 1 na 240 nm je iznosila 0,85±0,02) i 0,99 ml reagensa 2 (50 mM K–Na–fosfatni pufer pH 7) uz dodavanje 10 µl uzorka. Finalna zapremina reakcione smeše u kiveti je bila 1,5 ml. Jedinica (U) aktivnosti katalaza se definiše kao količina enzima koja razgradi 1 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za 1 min. Aktivnost CAT je izražavana u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvorenih proteina, a merena je na svakih 20 sekundi tokom 3 minuta, na temperaturi od 20 °C:

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

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

$\Delta A_0$  – promena apsorbance rastvora koji je predstavljao slepu probu ( $\text{min}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$V_k$  – zapremina reakcione smeše (ml),

$V_e$  – zapremina uzorka (ml),

0,0436 – milimolarni ekstinkcioni koeficijent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 240 nm ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Wup – količina ukupnih proteina dobijena na osnovu Bradford-ove krive (mg)

Sva merenja za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaza su rađena u 3 ponavljanja.

### 3.7.1.5. Određivanje aktivnosti peroksidaza

Za potvrđivanje peroksidazne aktivnosti, gelovi su nakon native elektroforeze u trajanju od 4h, inkubirani u 50 mM kalijum fosfatnom puferu (pH 6,5) koji je sadržao 10% rastvor 4-hloro- $\alpha$ -naftola i 0,03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do pojave plavo-sivih traka. Nakon ove reakcije gelovi su ispirani vodom i fotografisani.

Aktivnost ukupnih peroksidaza je praćena spektrofotometrijski merenjem promene apsorbance na 430 nm ( $\epsilon_{430}=2,47 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Korišćeno je 1,4 ml 0,05 M K–P pufera (pH 6,5), 30  $\mu\text{l}$  1 M pirogalola (Sigma) kao supstrata za enzim i 10  $\mu\text{l}$  uzorka, uz dodatak 30  $\mu\text{l}$  1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aktivnost je merena na svakih 20 sekundi tokom 3 minuta, a izražavana je u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvorenih proteina (U/mg). Detekcija enzimske aktivnosti se zasniva na reakciji između supstrata pirogalola i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Oksidacijom pirogalola nastaje crvenkasto obojen purpurogalin, sa maksimumom apsorpcije na 430 nm. Enzimska aktivnost je određivana prema formuli:

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

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

$\Delta A_0$  – promena apsorbance rastvora koji je predstavljao slepu probu ( $\text{min}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$V_k$  – zapremina reakcione smeše (ml)

$V_e$  – zapremina uzorka (ml)

$W_{\text{up}}$  – količina ukupnih proteina dobijena na osnovu Bradford-ove krive (mg)

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

Sva merenja za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti peroksidaza su rađena u 3 ponavljanja.

### **3.7.2. Analiza arabinogalaktanskih proteina**

Koncentracije i profil AGP u odsečcima listova kičice tokom morfogeneze određivani su radijalnom difuzijom i ukrštenom elektroforezom. Za radijalnu difuziju i ukrštenu elektroforezu korišćen je komercijalni  $\beta$ GlcY (Biosupplies Australia Ltd., Victoria, Australia). Yariv reagens kit (4- $\beta$ -glukopiranozilfenilazo-2,4,6-trihidrogenbenzen) čine  $\beta$ GlcY i gumiarabika kao standard. Koncentracija AGP je određivana u eksplantatima gajenim na hranljivim podlogama u koje je dodat  $\beta$ GlcY, koji su sakupljeni 28. dana od početka eksperimenta. Koncentracija AGP je takođe određivana u eksplantatima gajenim na BM5 hranljivoj podlozi, na svetlosti, u eksplantatima gajenim na BM6 hranljivoj podlozi, u mraku, kao i u eksplantatima gajenim na BM hranljivoj podlozi, na svetlosti ili u mraku, koji su sakupljeni u različitim vremenskim intervalima od početka eksperimenta, tj. nakon 3, 5, 7, 10, 15, 20 i 28 dana.

#### **3.7.2.1. Izolacija arabinogalaktanskih proteina**

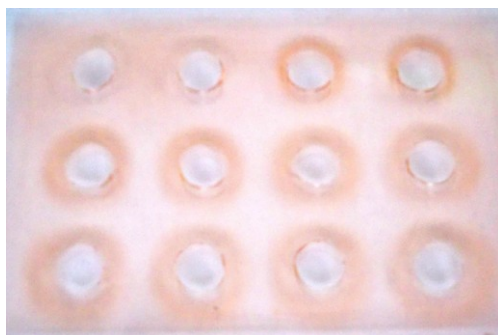
Ukupni proteini su izolovani prema metodi van Holst-a i Clarke-a (1985) koja je modifikovana (Trifunović i sar., 2014). Odsecci listova (400-500 mg) su spraseni u tečnom azotu, a zatim je dodat pufer za ekstrakciju (1,5 ml). Pufer za ekstrakciju arabinogalaktanskih proteina je sadržao 50 mM Tris-HCl, pH8, 10 mM EDTA, 1 M DTT i 1% Triton X- 100. Posle ekstrakcije ćelijske strukture su razbijene ultrazvukom u trajanju od 1 min, a zatim su uzorci inkubirani 24 h na temperaturi od 4-8 °C i potom centrifugirani 10 min na 4000 g, na 4 °C. Supernatanti su korišćeni za određivanje koncentracije AGP radijalnom difuzijom i kvalitativnih osobina AGP ukrštenom elektroforezom.

#### **3.7.2.2. Određivanje koncentracije arabinogalaktanskih proteina radijalnom difuzijom**

Koncentracija AGP u odsečcima listova je određivana radijalnom difuzijom prema metodi van Holst-a i Clarke-a (1985) i Popper-a (2011). Rastvor sa 1% agaroze, 0,15 M NaCl, 0,02 M NaN<sub>3</sub> i 10  $\mu$ g/ml  $\beta$ GlcY je zagrevan do ključanja i razlivan na



dve staklene pločice površine 5 x 7 cm (5 ml gela). U gelu debljine 1 mm pravljena su udubljenja prečnika 8 mm pomoću šireg dela Pasterove pipete. Standardna kriva je dobijena na osnovu radijalne difuzije izvedene sa serijom razblaženja standardnog rastvora gumiarabike (opseg koncentracija od 0 do 1 mg/ml). Po 30  $\mu$ l rastvora je dodavano u udubljenja u gelu, a zatim su pločice ostavljene preko noći u vlažnoj komori i posle 48 sati mereni su prečnici formiranih crvenih krugova pomoću milimetarskog papira (**Slika 7**). Na osnovu standardne krive dobijene merenjem prečnika precipitacije gumiarabike kao standarda, određivana je koncentracija AGP u uzorku. Eksperiment je ponovljen tri puta.

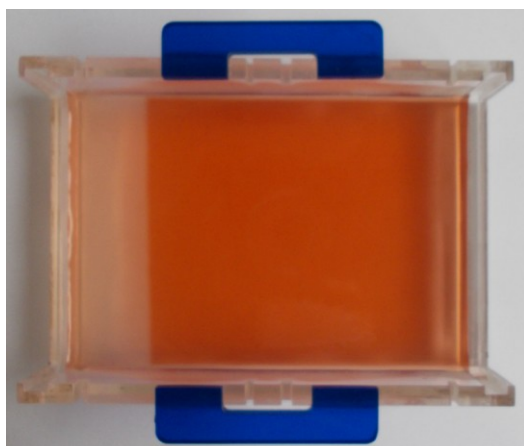


**Slika 7.** Određivanje koncentracije arabinogalaktanskih proteina radijalnom difuzijom sa rastućim koncentracijama gumiarabike kao standardom.

### **3.7.2.3. Određivanje kvalitativnih osobina arabinogalaktanskih proteina ukrštenom elektroforezom**

AGP su analizirani u uzorcima ukrštenom elektroforezom, prema modifikovanoj metodi van Holst-a i Clarke-a (1986). U prvom koraku elektroforeze se vrši razdvajanje AGP na gelu na osnovu njihove veličine i naelektrisanja. U drugoj elektroforezi, koja je pod uglom od 90 stepeni u odnosu na prvu, pomoću gela koji sadrži  $\beta$ GlcY, formira se crvena precipitaciona linija interakcijom između  $\beta$ GlcY i AGP. Osnovni rastvor za oba gela je isti i sadrži 1% agarozu, 0,025 M Tris i 0,2 M glicin, pH 8,3. Prvi gel (30 ml) je zagrejan do ključanja i razliven u kadicu za elektroforezu (10 x 7 cm), sa češljem (7 x 1,5 mm) da bi se formirala udubljenja. Jedno udubljenje ispunjeno je sa 0,2 mg/l bromfenol plave boje (45  $\mu$ l), a drugi sa 100  $\mu$ l uzorka. Gelovi su izloženi naponu od 100 V tokom 1h 30 min dok se boja ne pomeri 7 cm. Puffer koji je korišćen sadržao je

0,025 M Tris i 0,2 M glicin, pH 8,3. Posle prve elektroforeze isecan je segment gela dimenzija 1,5 x 7 cm na kome su razdvojeni AGP i postavljan je pod pravim uglom u odnosu na pravac druge elektroforeze u cilju dobijanja profila AGP (**Slika 8**). Na taj način AGP raspoređeni na prvom gelu prelaze na drugi gel pod uglom od 90<sup>0</sup>. Drugi gel sadrži 30 ml osnovnog rastvora sa dodatkom 30 µg/ml βGlcY. Zagrevan je do ključanja, a zatim razlivan do ivice prvog gela. Drugi gel izložen je naponu od 40 V tokom 2 sata nakon čega se na drugom gelu mogao uočiti profil AGP.



**Slika 8.** Izgled elektroforetske kadice pre puštanja druge elektroforeze (“crossed electroforesis“)

#### **3.7.2.4. Imunohistohemijska lokalizacija arabinogalaktanskih proteina**

Uzorci biljnih tkiva su fiksirani u FAA fiksativu (10 ml 37% formaldehida i 5 ml glacijalne sirćetne kiseline rastvoreni u 85 ml 70% etanola) na 4 °C. Svi uzorci dalje su podvrgnuti anatomskim istraživanjima primenom parafinske tehnike pravljenja trajnih preparata. Parafinski preseći debljine 10 µm su lepljeni na SuperFrost Plus pločice (VWR International, Strasbourg, France). Indirektna imunohistohemijska lokalizacija arabinogalaktanskih proteina je izvedena prema proceduri Knox-a i saradnika (1989). Deparafinisani preseći tkiva su rehidrirani u seriji rastvora etanola i isprani u destilovanoj vodi i PBS puferu (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,2). Potom su tretirani 1 h u 3% rastvoru proteina mleka ("Carnation-milk protein") u PBS puferu. Preseći su dalje inkubirani sa

razblaženim primarnim monoklonalnim antitelima (1:5) u mešavini proteina mleka i PBS pufera u trajanju od 24 sata na 4 °C. Sva monoklonalna antitela su dobijena od Prof. Dr. J. P. Knox, Leeds, Laboratorija za ćelijski zid biljaka, Velika Britanija (**Tabela 5**).

Posle tri ispiranja u PBS u trajanju od 5 minuta, preseći su inkubirani sa sekundarnim antitelom povezanim sa fluorescentnom bojom fluorescein izotiocijanat FITC (anti-rat-IgG /whole molecule/ linked with FITC, F6258, Sigma), razblaženim 100 puta u rastvoru proteina mleka i PBS. Inkubacija sa sekundarnim antitelom je trajala sat vremena u mraku, na sobnoj temperaturi. Preseći su potom ispirani tri puta u PBS i na njih je nanošena smeša glicerola i PBS (1:1), a potom su pokriveni pokrovnom pločicom. Fluorescentna boja je ekcitovana na talasnoj dužini 495 nm argon laserom. Fluorescencija je merena na registrovana na 525 nm, na mikroskopu CLSM 510 (Carl Zeiss).

**Tabela 5.** Monoklonalna antitela korišćena za detekciju arabinogalaktanskih proteina.

Antitelo	Epitop	Referenca
JIM4	$\beta$ -D-GlcpA-(1→3)- $\alpha$ -D-GalpA-(1→2)-L-Rha	Yates i sar. (1996)
JIM13	$\beta$ -D-GlcpA-(1→3)- $\alpha$ -D-GalpA-(1→2)-L-Rha	Yates i sar. (1996)
LM2	$\beta$ -D-GlcpA	Smallwood i sar. (1994); Yates i sar. (1996)

### 3.8. Sekvenciranje *AGP* gena i njihova ekspresija tokom morfogeneze

Molekularna istraživanja morfogeneze *in vitro* obuhvatila su identifikaciju 5 gena kičice koji kodiraju sintezu arabinogalaktanskih proteina, sekvenciranje i analizu ekspresije identifikovanih potencijalnih *AGP* gena kičice.

#### 3.8.1. Identifikacija *AGP* sekvenci kičice

Polazna osnova za identifikaciju *AGP* gena kičice je bio sekvenciran i rekonstruisan transkriptom lista i korena kičice (Simonović i sar., 2015). Identifikacija *AGP* sekvenci kičice je urađena pretraživanjem baza sekvenci lista i korena pomoću

algoritma BLAST ("*Basic Local Alignment Search Tool*"), u okviru programa BioEdit (Hall, 1999), pri čemu su kao upitne sekvence korišćene poznate AGP sekvence drugih biljaka preuzete iz baze GenBank. Ukupno je korišćeno 86 sekvenci za pretraživanje, 6 sekvenci *G. hirsutum*, 27 sekvenci *Catharanthus roseus*, 34 sekvence *A. thaliana*, 1 sekvenca *C. intybus*, 4 sekvence soje (*Glycine max*), 8 sekvenci vinove loze (*Vitis vinifera*) i 6 sekvenci kukuruza (*Zea mays*).

### **3.8.2. Direktno sekvenciranje identifikovanih potencijalnih AGP gena kičice**

Na osnovu pretraživanja baze podataka sekvenci korena i lista kičice pomoću poznatih sekvenci gena koji kodiraju sintezu AGP drugih biljaka, pronađeno je 5 potencijalnih gena kičice: *CeAGP1*, *CeAGP2*, *CeAGP3*, *CeAGP4* i *CeAGP5*. Ispravnost ovih sekvenci je proverena direktnim sekvenciranjem.

#### **3.8.2.1. Izolacija RNK**

Ukupna RNK iz lisnih eksplantata je izolovana korišćenjem TRIZOL reagensa (Life Technologies). Voda, svi rastvori, kao i svi korišćeni sudovi prethodno su tretirani dietilpirokarbonatom (*DEPC*), snažnim inhibitorom ribonukleaza. Prilikom izolacije 500 mg biljnog materijala je samleveno u avanu u tečnom azotu, nakon čega je usledila homogenizacija sa 1 ml hladnog Trizol-a. Potom su homogenati prebačeni u "*RNAse-free*" sterilne Ependorf-epruvete koje su stajale 5 minuta na sobnoj temperaturi da bi došlo do disocijacije nukleoproteinskih kompleksa. U svaki uzorak dodato je po 200 µl smeše hloroform:izoamil alkohol (24:1, v/v). Ependorf-epruvete su mućkane na rotacionoj mehaničkoj mešalici 20 sekundi, inkubirane 3 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirane na 12000 g na 4 °C, 10 min. Gornja vodena faza je prebacivana u nove Ependorf-epruvete i dodato je po 250 µl izopropanola i rastvora za precipitaciju RNK. Rastvor za precipitaciju RNK sadržao je 0,4 M natrijum-hlorid, 0,8 M natrijum citrat i 0,8 M hlorovodoničnu kiselinu. Ependorf-epruvete su promućkane i ostavljene 30 min na -20 °C. Nakon precipitacije uzorci su centrifugirani na 12000 g na 4 °C, 10 min. RNK se mogla uočiti u formi belog taloga. Supernatant je odstranjen, a talog RNK je

ispiran dodavanjem 1 ml hladnog 75% etanola, centrifugiran na 12000 g 3 min, pa zatim sušen na vazduhu u aseptičnim uslovima 5-10 min. RNK je rastvorena u 100 µl DEPC vode i čuvana u zamrzivaču (−80 °C).

Kvantitet izolovane RNK je određen na spektrofotometru (Agilent 8453), na talasnim dužinama 260 i 280 nm, i izračunavan prema formuli:

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

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

Kvalitet izolovane RNK verifikovan je elektroforezom u 2% agaroznom gelu.

### 3.8.2.2. Tretman DNK-azom

Uklanjanje genomske DNK iz uzoraka RNK je postignuto pomoću enzima DNK-aze. Finalna zapremina reakcione smeše je bila 10 µl (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Sastav reakcione smeše za tretman DNK-azom.

Komponenta	µl
RNK, 2 µg	6,5
10 x reakcioni pufer za DNK-azu sa MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)	1,0
DNK-aza (1 U/ µl)	2,0
RNK-aze inhibitor (Fermentas, 40U/ µl)	0,5
Ukupna zapremina	10,0

Tretman DNK-azom odvijao se 30 min na 37 °C, a potom je DNK-aza inaktivirana inkubacijom na 65 °C tokom 10 min, u prisustvu 1 µl 25 mM EDTA (Fermentas, Lithuania) po reakciji.

### 3.8.2.3. Reverzna transkripcija (RT)

Reverzna transkripcija je urađena pomoću Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit-a (Fermentas) i odvijala se u aparatu *Genius* Thermocycler (Techne, Cambridge, UK). Jedna reakcija za 2 µg RNK je sadržala komponente prikazane u **Tabeli 7**.

**Tabela 7.** Sastav reakcione smeše pojedinačne RT reakcije.

<b>Komponenta</b>	<b>μl</b>
RNK iz prethodnog koraka (2μg)	11
poly(dT) <sub>18</sub> prajmeri	1
5 x reakcioni pufer	4
inhibitor RNKze <i>RiboLock RI</i> (20 U/ μl)	1
dNTP miks (10 mM svaki)	2
reverzna transkriptaza (200 U/ μl)	1
<b>Ukupna zapremina</b>	<b>20</b>

**Uslovi RT reakcije:**

RT reakcija se odvijala u dva koraka:

1. Reverzna transkripcija, 42 °C, 60 min
2. Inaktivacija enzima, 70 °C, 5 min.

**3.8.2.4. PCR amplifikacija**

Dobijena jednolančana cDNK zatim je umnožena PCR reakcijom radi potvrđivanja specifičnosti prajmera dizajniranih za amplifikaciju regiona koji bi se mogli sekvencirati. Dobijena cDNK (koja odgovara količini od 100 ng/μl RNK) je korišćena u PCR reakciji prema protokolu za Taq DNA Polimerazu (Fermentas recombinant, EP0401). Svaka pojedinačna PCR reakcija odvijala se u smeši zapremine 50 μl (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Sastav reakcione smeše PCR reakcije

<b>Komponenta</b>	<b>μl</b>
10 x PCR pufer (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4,0
10 mM dNTP mix	1
R+F prajmeri (svaki 7,5 μM)	6,6
5 U/μl Taq DNK polimeraza	0,8
H <sub>2</sub> O	30,6
100 ng/μl cDNK	2,0
<b>Ukupna zapremina</b>	<b>50,0</b>

**Uslovi PCR reakcije:**

1. Početna denaturacija nukleinskih kiselina odvijala se na 95 °C, 5 min
2. 40 ciklusa:

- a) Denaturacija na 95 °C, 30 s
  - b) Vezivanje prajmera na 56 °C, 30 s
  - c) Ekstenzija na 72 °C, 30 s
3. Finalna ekstenzija na 72 °C, 10 min

Sve PCR reakcije odvijale su se u aparatu *Genius* Thermocycler (Techne, Cambridge, UK).

Za svaki od potencijalnih *AGP* gena kičice su dizajnirani parovi prajmera za amplifikaciju regiona cDNK od oko 500 bp, koji bi mogli biti sekvencirani. Za transkripte duže od 500 bp, dizajnirano je više parova prajmera koji amplifikuju početak, sredinu ili kraj transkripta (**Tabela 9**). Specifičnost prajmera potvrđena je gel elektroforezom, razdvajanjem RT-PCR produkata u agaroznom gelu. Posle završene elektroforeze gelovi su fotografisani u transiluminatoru (UltraLum Inc, Gel Explorer, Exton, PA). Analiza dobijenih PCR produkata je rađena u programu Total Lab (TotalLab TL 120 v2009, Nonlinear Dynamics Ltd.), tako što je dužina amplikona *AGP* gena kičice poređena sa fragmentima komercijalnog markera 100 bp Plus DNK ladder (Fermentas).

**Tabela 9.** Prajmeri koji su korišćeni za sekvenciranje gena

Gen	Prajmeri	Amplikon
<i>CeAGP1</i> početak	F: 5'-CAT CAA CAA CTG GGT CTC AC-3'	410 bp
	R: 5'-AAC CCT TTA AGA ACC CAA GC-3	
<i>CeAGP1</i> kraj	F: 5'-CAC TGC AGG ACC AAA CAT AC-3'	519bp
	R: 5'-TTG CAA TGC ACA ACC ATT CT-3'	
<i>CeAGP2</i> početak	F: 5'-CTC CAC ATA GCA GGT AAG GA-3'	504bp
	R: 5'-GAT TCC GGA GTA TCA AAC CG-3'	
<i>CeAGP2</i> sredina	F: 5'-CAA ATA CGC GGA TCC ATC AT-3'	585bp
	R: 5'-AGC TTG AGG TCA ATT TCA GC-3'	
<i>CeAGP2</i> kraj	F: 5'-TCG TCG GGT CGG GTA AT-3'	588bp
	R: 5'-GCC ATA GAA CCT TCA AGA GAG-3	
<i>CeAGP3</i>	F: 5'-CCA TTT ATG CCT GAG CAG TT-3'	494bp
	R: 5'-CTT CCT CCT GAG GCC CAT TG-3	
<i>CeAGP4</i> početak	F: 5'-TTT GCC TTT TCA CCT CAC AT-3'	552bp
	R: 5'-GTT AAC AAT CCG GGA GCA AT-3	
<i>CeAGP4</i> kraj	F: 5'-CTC CTA GTG CGT CTG ATT TC-3'	567bp
	R: 5'-GTG GAG ACA TAG ATG GCG AA-3	
<i>CeAGP5</i> početak	F: 5'-ACA AAG ATC ACA TAT GGT TTC TC-3'	541bp
	R: 5'-GAC GGT GTG GAA TTT GAG AT-3	
<i>CeAGP5</i> kraj	F: 5'-TCT CAG CAC GAA CAT AAA GC-3'	272bp
	R: 5'-GGA ATC GGA ATC CCT AGT GT-3	

### 3.8.2.5. Prečišćavanje PCR produkata

PCR produkti su razdvojeni elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu na 100V u trajanju od 75 min. Amplifikovan materijal je prečišćen iz gela upotrebom kompleta za ekstrakciju DNK iz gela (Silica Bead DNA Gel Extraction Kit, Thermo Scientific, KO513) po proceduri proizvođača. Trake na gelu, koje su bile uočljive pri UV osvetljenju, su pažljivo odsecane skalpelom i ubacivane u Ependorf-epruvete kojima je prethodno izmerena masa. U Ependorf-epruvete je dodato 4½ zapremine rastvora za vezivanje (eng. "*binding solution*") i ½ zapremine pufera za konverziju (eng. "*TBE conversion buffer*") u odnosu na zapreminu gela. Nakon inkubacije na 55 °C u trajanju od najmanje 5 minuta radi otapanja agaroze, dodato je 5 µl silikatnog praha koji ima visok afinitet za vezivanje DNK pri visokim koncentracijama soli. Uzorci u Ependorf-epruvetama su inkubirani još 8 minuta na 55 °C i centrifugirani na 13000 obrtaja u minuti, 15 sekundi. Supernatant je odbačen a talog je ispran sa 500 µl pufera za ispiranje. Nakon ponovnog centrifugiranja na 13000 obrtaja u minuti u trajanju od 15 sekundi, ceo postupak odbacivanja supernatanta i ispiranja taloga je ponovljen još dva puta. Talog je sušen na vazduhu tokom 20 minuta, a zatim je resuspendovan u 10 µl MQ vode i inkubiran na 55 °C u trajanju od 5 minuta. Nakon centrifugiranja na 13000 obrtaja u minuti u trajanju od 30 sekundi, supernatant u kome se nalazi prečišćena DNK je pažljivo odvojen u novu Ependorf-epruvetu i postupak dodavanja vode (10 i 5 µl), inkubacije i centrifugiranja je ponovljen još dva puta.

### 3.8.2.6. Direktno sekvenciranje cDNA potencijalnih AGP transkripata

Sekvenciranje je obavljeno u oba smera i to primenom modifikovane metode po Sanger-u ("*dye-terminator sequencing*"). Ova modifikacija se zasniva na primeni fluorescentno obeleženih didezoksinukleotida (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP; po jedna fluorescentna boja za svaki tip ddNTP) koji se u jedinstvenoj reakciji sinteze DNK ugrađuju u rastući lanac i prekidaju sintezu. Dobijeni fragmenti, dužine različite za po jednu bazu, se razdvajaju automatskom elektroforezom a tip inkorporiranog ddNTP, tj. sekvenca se očitava prema talasnoj dužini emitovanog fluorescentnog signala



nakon pobuđivanja laserom u automatskom sekvenatoru. Za samu proceduru sekvenciranja upotrebljen je komplet za sekvenciranje BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, SAD).

Sastav PCR smeše za sekvenciranje je dat u **Tabeli 10**. Prajmeri koji su korišćeni za sekvenciranje opisani su u **Tabeli 9**, osim prajmera za kraj *AGP4* gena.

**Tabela 10.** PCR Reakciona smeša za sekvenciranje

<b>Komponenta</b>	<b>µl</b>
Reakcioni miks (engl. "Ready Reaction Mix")	4
5X Pufer	2
2 µM prajmer ("forward" ili "reverse")	2
Prečišćeni uzorak	5
MQ voda, bez nukleaze	7
<b>Ukupna zapremina</b>	<b>20</b>

**Uslovi PCR reakcije za sekvenciranje:**

1. Početna denaturacija nukleinskih kiselina odvijala se na 96 °C, 1 min
2. 25 ciklusa:
  - a) Denaturacija na 96 °C, 10 s
  - b) Vezivanje prajmera na 50 °C, 5 s
  - c) Ekstenzija na 60 °C, 4 min
3. 4 °C neograničeno dugo

Sve PCR reakcije odvijale su se u aparatu *Genius* Thermocycler (Techne, Cambridge, UK).

Nakon dodavanja EDTA (25 mM finalno) i EtOH (70-75% finalno), dobijeni PCR proizvodi su inkubirani 15 min na sobnoj temperaturi a potom centrifugirani 30-45 min na 6000 obrtaja u minuti i temperaturi od 4 °C. Odliven je supernatant i dodata nova količina 70% EtOH i smeša ponovo centrifugirana ali ovog puta 25 min na 5000 obrtaja u minuti na istoj temperaturi od 4 °C. Supernatant je ponovo odliven a dobijeni

talog je osušen na 90 °C. Fragmentima u talogu je dodato 15 µl Hi-dye formamida (Applied Biosystems, SAD) kako bi se efikasno denaturisali na 95 °C u trajanju od 2 minuta. Amplikoni (10 µl) rastvoreni u formamidu su potom podvrgnuti automatskoj elektroforezi i očitavanju sekvence na aparatu ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, SAD).

### **3.8.2.7. Bioinformatička analiza proteinskih sekvenci AGP kičice**

Aminokiselinske sekvence AGP kičice su određene putem konceptualne translacije sekvenciranih nukleotidnih sekvenci, a zatim su upoređene sa aminokiselinskim sekvencama ortologih proteina iz drugih biljaka. Pretraživanje i selekcija sekvenci za poređenje su izvršene pomoću programa Protein Blast ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)), koji analizira sekvence kako bi identifikovao one koje su slične. Za višestruko poređenje sekvenci korišćeni su programi ClustalOmega (Sievers i sar., 2011) i Jalview (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, Waterhouse i sar., 2009). Sekvence su analizirane radi predikcije prisustva N-signalnog peptida i GPI signala na C-terminusu pomoću programa SignalP 4.0. ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), Petersen i sar., 2011) i big-PI Plant Predictor ([http://mendel.imp.ac.at/gpi/plant\\_server.html](http://mendel.imp.ac.at/gpi/plant_server.html), Eisenhaber i sar., 2003), respektivno. Predviđena mesta N-glikozilacije su identifikovana pomoću programa NetNGlyc 1.0. Server ([www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)). AG-II glikomoduli, koji predstavljaju potencijalna mesta O-glikozilacije, su pretraživani manuelno.

### **3.8.3. RT-PCR i qRT-PCR analiza ekspresije gena koji kodiraju sintezu arabinogalaktanskih proteina kičice**

Za analizu ekspresije gena koji kodiraju sintezu AGP kičice sakupljeni su odsecci listova gajeni na BM hranljivoj podlozi, na svetlosti ili u mraku, i na BM5 hranljivoj podlozi, na svetlosti, odnosno na BM6 podlozi, u mraku. Uzorci su sakupljeni posle 3, 5, 7, 10, 15 i 20 dana od početka eksperimenta. RT-PCR analizom pokazana je

transkripcija gena koji kodiraju AGP, dok su nivo i dinamika transkripcije određeni qRT-PCR analizom. Uzorci su do upotrebe čuvani u zamrzivaču na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.8.3.1. PCR amplifikacija

Izolacija RNK, tretman DNK-azom i RT reakcija su urađene na prethodno opisan način (poglavljja 3.8.2.1., 3.8.2.2. i 3.8.2.3). U cilju potvrđivanja specifičnosti dizajniranih prajmera za q-PCR jednolančana cDNK je umnožena PCR reakcijom. Svaka pojedinačna PCR reakcija odvijala se u smeši zapremine 50  $\mu\text{l}$ , a komponente i uslovi PCR reakcije su opisani u poglavljju 3.8.2.4. Prajmeri za potencijalne *AGP* gene kičice (*CeAGP1* – *CeAGP5*) su dizajnirani pomoću programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Prajmeri ("Forward" i "Reverse") korišćeni za amplifikaciju fragmenata pretpostavljenih pet gena koji kodiraju sintezu arabinogalaktanskih proteina kičice u PCR reakcijama prikazani su u **Tabeli 11**. Specifičnost svih korišćenih prajmera potvrđena je na dva načina, gel elektroforezom RT-PCR produkata i analizom krive topljenja posle qRT-PCR reakcije.

PCR produkti su razdvojeni elektroforezom u agaroznom gelu na prethodno opisani način (poglavlje 3.8.2.4), a zatim analizirani poređenjem dužine amplikona *AGP* gena kičice sa fragmentima komercijalnog markera 50 bp DNK ladder (Fermentas, SM 1133).

**Tabela 11.** Prajmeri korišćeni u PCR reakcijama

Gen	Prajmeri	Dužina amplikona (bp)
<i>CeAGP1</i>	F: 5'-GAC CGT TTG GAA TTG AGA CA-3'	166
	R: 5'-ACT CAA CAA CTC AAA CTC CG-3	
<i>CeAGP2</i>	F: 5'-CAA ATA CGC GGA TCC ATC AT-3'	157
	R: 5'-GAT TCC GGA GTA TCA AAC GG-3	
<i>CeAGP3</i>	F: 5'-CCA TTT ATG CCT GAG CAG TT-3'	153
	R: 5'-CTT CTA ATG CTG GTG GCT TT-3	
<i>CeAGP4</i>	F: 5'-AGA TCT CGG TCA CGT GAA TA-3'	171
	R: 5'-GTT AAC AAT CCG GGA GCA AT-3	
<i>CeAGP5</i>	F: 5'-TCT CAG CAC GAA CAT AAA GC-3'	160
	R: 5'-GAC GGT GTG GAA TTT GAG AT-3	
<i>18S rRNK</i>	F: 5'-TGA CGG AGA ATT AGG GTT CG-3'	190 bp
	R: 5'-CAA TGG ATC CTC GTT AAG GG-3	

### 3.8.3.2. Priprema standarda za qRT-PCR reakcije

Standardi za apsolutnu kvantifikaciju *CeAGP1*, *CeAGP2*, *CeAGP3*, *CeAGP4* i *CeAGP5* transkriptata su bili pripremljeni od dobijene cDNA koja je amplifikovana specifičnim prajmerima. Dobijeni amplikoni su razdvojeni elektroforetski na 2,5% agaroznom gelu, ekstrahovani iz gela i spektrofotometrijski kvantifikovani. Za svaki gen je bila napravljena serija razblaženja od  $10^9$  do  $10^3$  kopija/ $\mu$ l, koja su potom korišćena kao standardi.

Ekstrakcija je rađena je Gene JET™ Gel Extraction Kit-om (Fermentas). Trake na gelu, koje su bile uočljive pri UV osvetljenju, su odsecane skalpelom, izmerene i ubačene u Ependorf-epruvete. U Ependorf-epruvete je sipan pufer za vezivanje ("*Binding Buffer*") u odnosu 1:1 (w/v). Sadržaj u Ependorf-epruvetama je inkubiran u vodenom kupatilu na 56 °C tokom 10 min da bi se gel u potpunosti rastvorio. Ependorf-epruvete su povremeno okretane da bi se ubrzalo rastvaranje gela. U Ependorf-epruvete je dodato 100  $\mu$ l 100% izopropanola i sadržaj je snažno promućkan. Sadržaj iz Ependorf-epruveta je zatim prebačen u kolone, centrifugiran je 1 min na 13000 obrtaja u minuti, filtrat je bačen, a kolone su vraćene u iste Ependorf-epruvete. Dodato je 700  $\mu$ l pufera za ispiranje ("*Wash Buffer*"). Ependorf-epruvete su centrifugirane 1 min na 13000 obrtaja u minuti. Filtrati su bačeni, a kolone su vraćene u iste Ependorf-epruvete. Prazne kolone su centrifugirane 1 min na 13000 obrtaja u minuti da bi se kompletno odstranili ostaci pufera za ispiranje. Kolone su prebačene u čiste Ependorf-epruvete od 2 ml u koje je dodato 50  $\mu$ l elucionog pufera ("*Elution Buffer*") i centrifugirane 1 min na 13000 obrtaja u minuti. Kolone su odstranjene, a filtrati, koji su sadržali DNK iz agaroznog gela, su čuvani na  $-20$  °C.

Kvantifikacija ekstrahovanih produkata RT-PCR reakcije je određena spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 260 nm (10  $\mu$ l uzorka DNK + 990  $\mu$ l Tris-HCl 10 mM pH 7,5) i izračunavana prema formuli:

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

Nakon spektrofotometrijske kvantifikacije napravljena je serija razblaženja od  $10^9$  do  $10^3$  kopija/ $\mu$ l, koja su korišćena kao standardi. Standardi su pravljene u tri

ponavljanja u Ependorf-epruветama od 0,2 ml. Za qPCR je uzimano po 1  $\mu$ l standarda.

### 3.8.3.3. Kvantitativni RT-PCR

Jednolančana cDNK dobijena u RT reakciji je korišćena u kvantitativnoj "real-time" PCR (qPCR) reakciji, koja je postavljena na optičkoj ploči sa 96 bunarića (MicroAmp™, Applied Biosystems). Svaka pojedinačna qPCR reakcija odvijala se u smeši zapremine 25  $\mu$ l. Komponente reakcije su prikazane u **Tabeli 12**.

**Tabela 12.** Sastav reakcione smeše pojedinačne qPCR reakcije.

Komponente reakcione smeše za qPCR reakciju	$\mu$ l
Syber Green Mix	12,5
R+F prajmeri (oba po 0,3 $\mu$ M)	1,0
voda	10,5
cDNK uzorka (100 ng / $\mu$ l) ili standard	1,0
<b>Ukupna zapremina</b>	<b>25,0</b>

Q-PCR analiza je urađena pomoću Maxima SYBR Green I Master Mix (Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X), Fermentas, Lithuania) koji je, od strane proizvođača, već pripremljena smeša Taq DNK polimeraze, dNTP-a, fluorescentne boje SYBR Green i pasivne referentne fluorescentne ROX boje u odgovarajućem qPCR puferu. SYBR Green boja se vezuje za dvolančanu DNK na dva načina, interkaliranjem i za mali žljeb, pri čemu emituje fluorescentni signal koji se detektuje pomoću qPCR aparata u trenutku kada je signal najintenzivniji (za svaki ciklus), a to je na kraju koraka ekstenzije.

Za amplifikaciju fragmenata pet potencijalnih *AGP* gena kičice u qPCR reakcijama korišćeni su prajmeri (Forward i Reverse) prikazani u **Tabeli 11**. Radi provere ujednačenosti količine ukupne cDNK u svim uzorcima amplifikovan je i referentni gen za *18S rRNK* (Bogdanović i sar., 2013) (**Tabela 11**).

#### Uslovi qPCR reakcije:

1. Početna denaturacija odvijala se na 95 °C, 10 min
2. 40 ciklusa:
  - a) Denaturacija na 95 °C, 15 s

- b) Vezivanje prajmera na 56 °C, 30 s
- c) Ekstenzija na 72 °C, 30 s
- 3. Finalna ekstenzija na 72 °C, 10 min
- 4. Analiza krive topljenja

Sve qPCR reakcije urađene su u tri biološka ponavljanja u mašini ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems Co, Foster City, USA).

### **3.9. Statistička obrada podataka**

Za statističku analizu je korišćen softver STATGRAPHICS Centurion XVI. Podaci su podvrgnuti analizi varijanse (ANOVA), a za utvrđivanje statističke značajnosti razlika među srednjim vrednostima korišćen je test LSD („least significant difference“). Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je pomoću računarskog programa Microsoft Office Excel.

## 4. REZULTATI

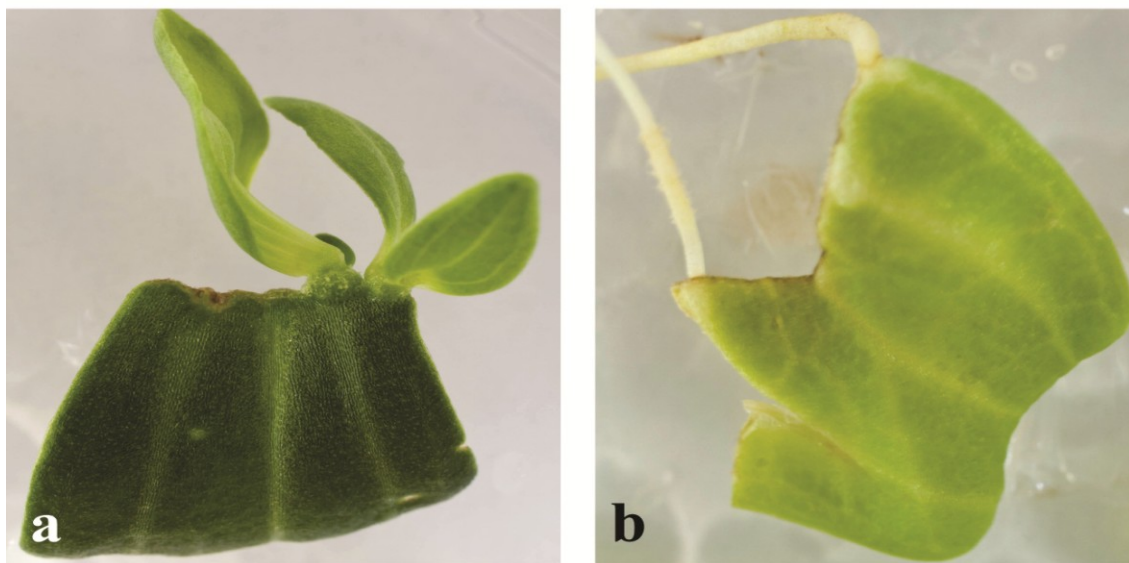
### 4.1. Proces morfogeneze *in vitro* iz odsečaka listova kičice

Sterilisana semena kičice su klijala na svetlosti na ½ BM hranljivoj podlozi i razvijali su se klijanci koji su gajeni na istoj podlozi radi uspostavljanja *in vitro* kultura kičice. Odsecci listova su izolovani sa *in vitro* gajenih biljaka, isecanjem dva para listova sa nodusa najbližih apeksu, i postavljeni su svojom abaksijalnom stranom na hranljive podloge za ispitivanje morfogeneze.

U cilju ispitivanja *in vitro* morfogeneze odsecci listova poreklom od *in vitro* gajenih biljka *C. erythraea* gajeni su na BM, BM1, BM2, BM3, BM4, BM5 i BM6 hranljivim podlogama sa regulatorima rastenja 2,4 D i CPPU (**Tabela 3**). Odsecci listova su gajeni na svetlosti (16 h svetlosti – 8 h mrak) ili u uslovima kontinualnog mraka.

Tokom prvih sedam dana gajenja eksplantata, na većini ispitivanih hranljivih podloga uočene su prve morfološke promene na odseccima listova. Odsecci listova su se uvećali i promenili oblik.

Kod odsečaka listova gajenih na BM hranljivoj podlozi, na svetlosti obrazovali su se adventivni pupoljci putem direktne organogeneze (**Slika 9a, Tabela 13**), mada je frekvenca pojave pupoljaka bila niska ( $20 \pm 5,8$ ). Kod eksplantata gajenih na BM hranljivoj podlozi, u mraku su se formirali adventivni korenovi putem direktne rizogeneze, 28 dana od početka eksperimenta (**Slika 9b**).



**Slika 9.** Organogeneza pupoljaka i korenova *in vitro* iz odsečaka listova *C. erythraea* Rafn. gajenih na BM hranljivoj podlozi nakon 28 dana: a) formiranje adventivnih pupoljaka na eksplantatima gajenim na svetlosti; b) direktna rizogeneza na eksplantatima gajenim u mraku.

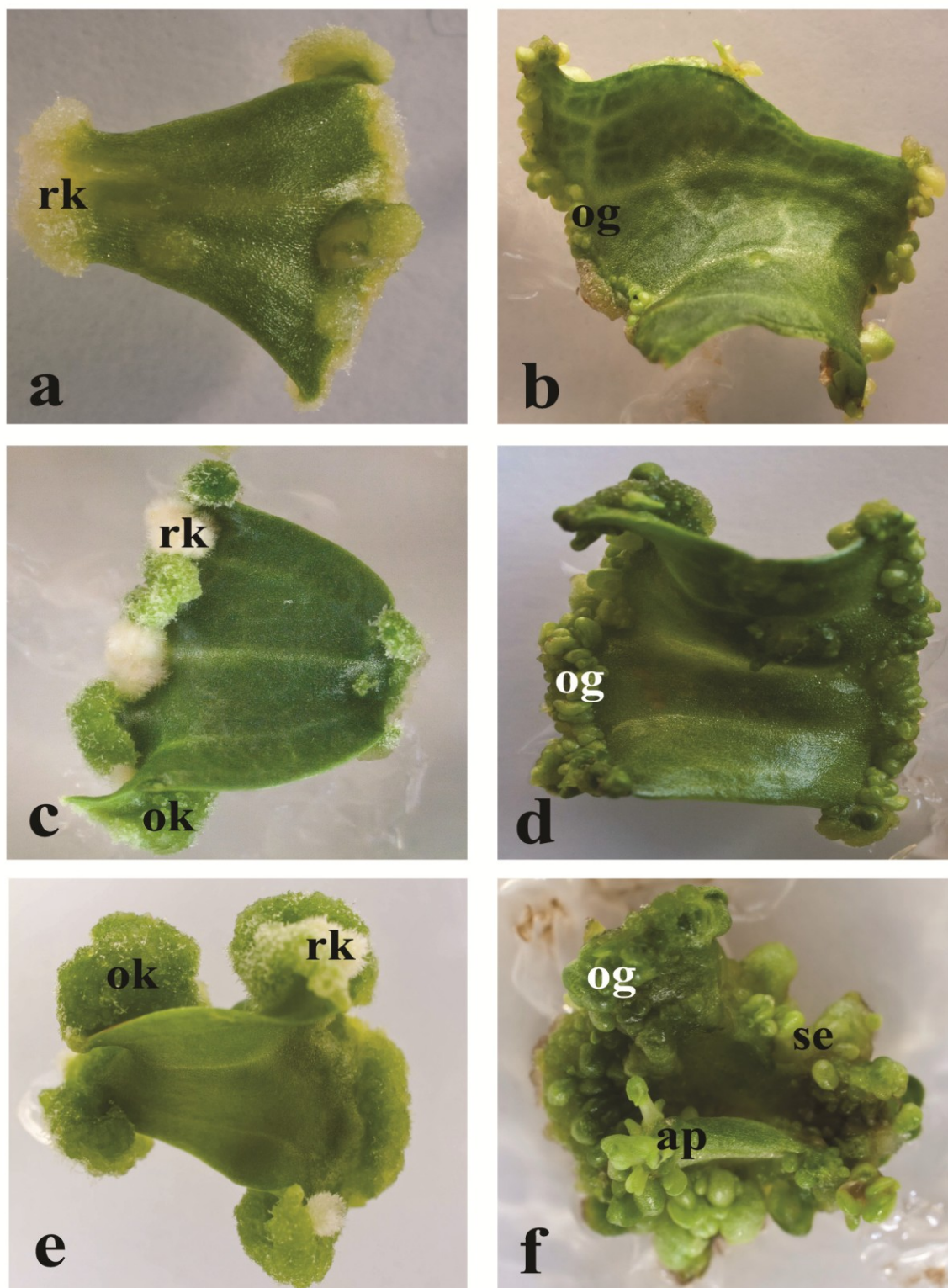
**Tabela 13** Efekat regulatora rastenja i uslova osvetljenja na formiranje kalusa, embriogenog kalusa i adventivnih pupoljaka. Podaci su sakupljeni nakon 28 dana gajenja odsečaka listova na hranljivim podlogama. Vrednosti predstavljaju prosečne vrednosti sa standardnim greškama. Oznake istog slova u okviru jedne kolone označavaju da nema statistički značajnih razlika (za  $\leq 0,05$ ) između srednjih vrednosti.

Hranljiva podloga	svetlost			mrak		
	% eksplantata sa kalusom	% eksplantata sa embriogenim kalusom	% eksplantata sa adventivnim pupoljcima	% eksplantata sa kalusom	% eksplantata sa embriogenim kalusom	% eksplantata sa adventivnim pupoljcima
BM	0,0 a	0,0 a	20±5,8 b	0,0 a	0,0 a	0,0
BM1	100,0 b	28,3±4,0 b	0,0 a	98,3±1,7b	13,3±4,2 a	0,0
BM2	100,0 b	93,3±4,2 c	28,3±6,0 bc	100,0±0 b	40,0±3,6 b	0,0
BM3	100,0 b	100,0±0,0 d	30,0±8,9 bc	100,0±0 b	51,7±7,5 bc	0,0
BM4	100,0 b	100,0±0,0 d	31,7±4,0 bc	100,0±0 b	60,0±8,2 cd	0,0
BM5	100,0 b	100,0±0,0 d	45,0±11,5 c	100,0±0 b	70,0±7,3 de	0,0
BM6	100,0 b	100,0±0,0 d	41,7±6,0 c	100,0±0 b	78,3±6,5 e	0,0

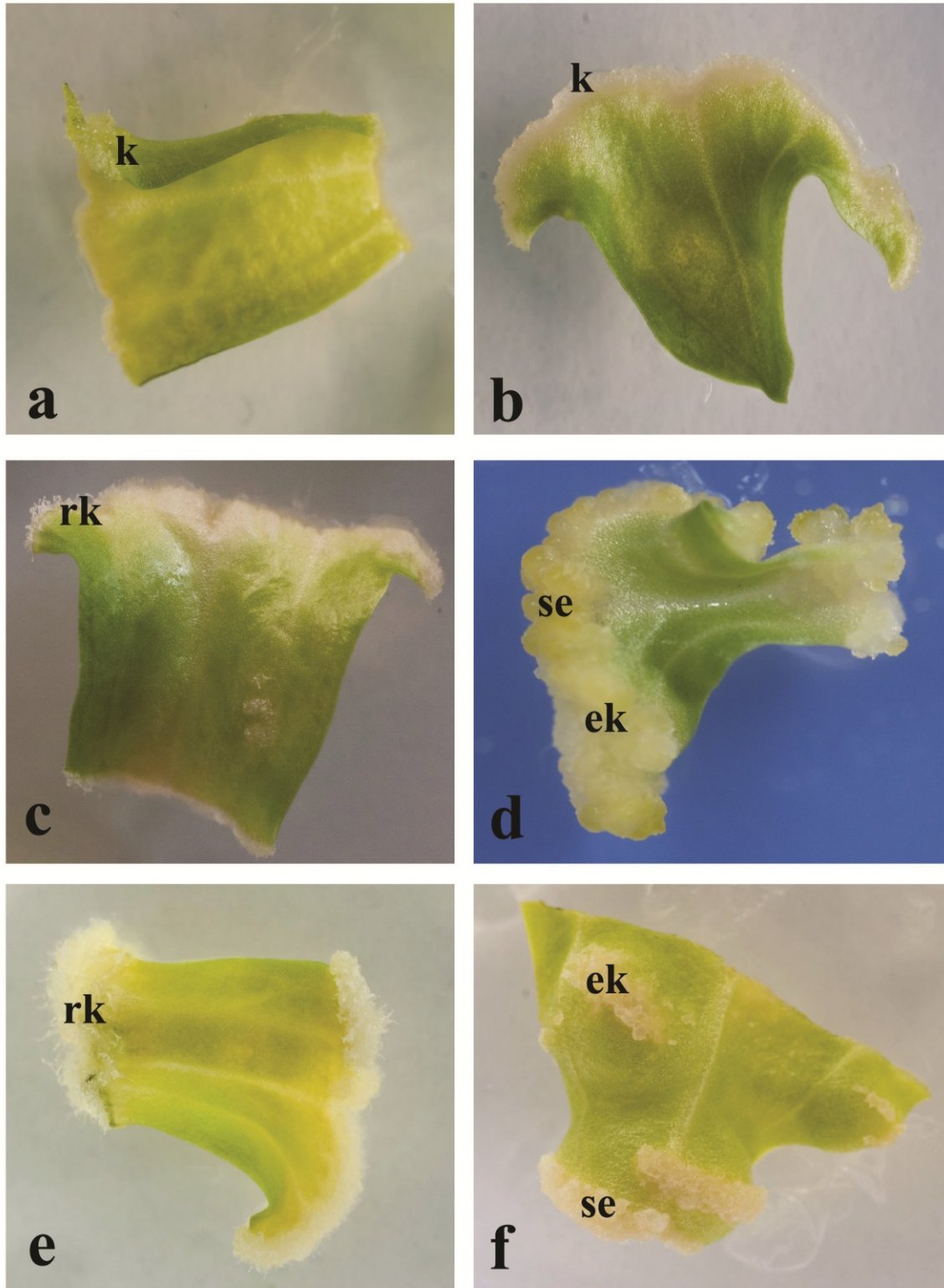
Tokom druge nedelje gajenja na hranljivim podlogama sa regulatorima rastenja, 2,4 D i CPPU, formirano je kalusno tkivo uglavnom po obodu izolovanog eksplanata i na svetlosti i u mraku (**Slike 10 i 11**). Proces dediferencijacije početnog eksplantata i formiranje kalusa su bili izraženiji u kulturama koje su gajene na svetlosti (**Slika 10**). 100% eksplantata gajenih na podlogama koje su sadržale CPPU i 2,4 D (BM1 - BM6),



formiralo je kaluse (**Tabela 13**). Na eksplantatima su uočene tri vrste kalusa: embriogeni, organogeni i rizogeni. Na BM1 hranljivoj podlozi gde je odnos auksina i citokinina bio u korist auksina preovladavao je rizogeni kalus (**Slike 10a, 10c, 10e, 11c i 11e**). Takođe je došlo i do formiranja embriogenog kalusa, ali je procenat eksplantata sa ovom vrstom kalusa niži kod eksplantata gajenih u mraku (13.3%) u odnosu na eksplantate koji su gajeni na svetlosti (28,3%) (**Tabela 13**). Na odsečcima listova gajenim na svetlosti na istoj BM1 hranljivoj podlozi, pored rizogenog i embriogenog kalusa, obrazovao se i organogeni kalus (**Slike 10c i 10e**).



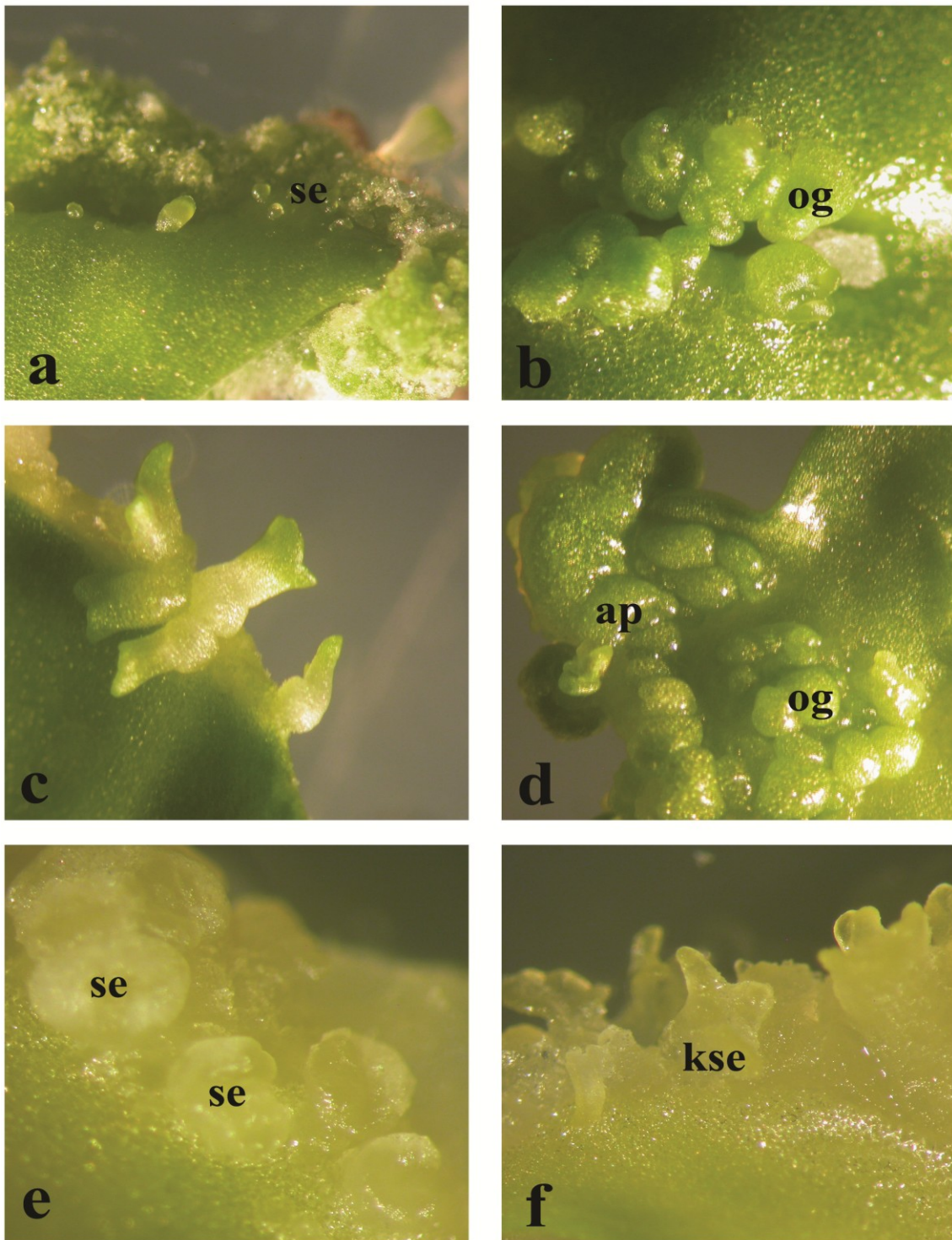
**Slika 10.** Proces formiranja kalusa i morfogeneze (SE i organogeneze pupoljaka) iz odsečaka listova *C. erythraea* gajenih na svetlosti: a – nakon 14 dana na BM1; b – nakon 14 dana na BM6; c - nakon 21 dana na BM1; d - nakon 21 dana na BM6; e - nakon 28 dana na BM1; f - nakon 28 dana na BM6; rk - rizogeni kalus; ok - organogeni kalus; og – organogena globula; se – somatski embrion; ap – adventivni pupoljak.



**Slika 11.** Proces formiranja kalusa i SE iz odsečaka listova *C. erythraea* gajenih u mraku: a – nakon 14 dana na BM1; b – nakon 14 dana na BM6; c - nakon 21 dana na BM1; d - nakon 21 dana na BM6; e - nakon 28 dana na BM1; f - nakon 28 dana na BM6; k – kalus; rk - rizogeni kalus; ek – embriogeni kalus; se – somatski embrion.

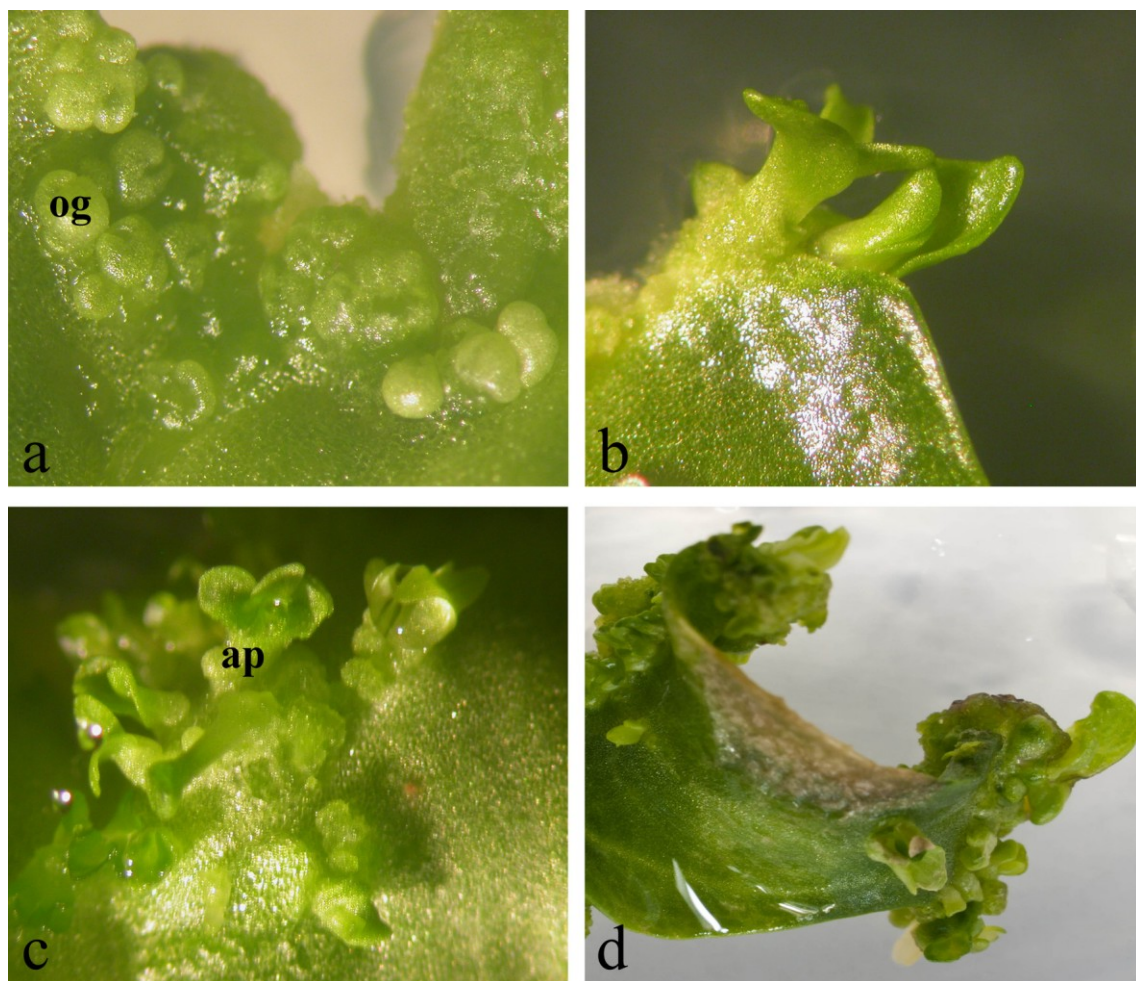
Sa porastom koncentracije CPPU mogao se uočiti porast broja eksplantata sa embriogenim kalusom bez obzira na uslove osvetljenja u kojima su eksplantati gajeni (**Tabela 13**). Takođe je CPPU primenjen u višim koncentracijama stimulisao proces indirektno somatske embriogeneze, na BM3-BM6 hranljivim podlogama (**Slike 10f, 11d, 11f, 12a, 12c, 12e i 12f, Tabela 13**). Proces SE kod kičice iz odsečaka listova uglavnom je indirektan, što znači da se prvo razvija embriogeni kalus, a potom se formiraju somatski embrioni. Somatski embrioni na globularnom stadijumu razvili su se deset dana nakon postavke eksplantata na podloge (**Slika 11d**). Na kraju subkulture na istom eksplantatu istovremeno su uočeni somatski embrioni na različitim stupnjevima razvića, što ukazuje na asinhronost procesa SE (**Slika 12**).





**Slika 12.** Proces SE i organogeneze *in vitro* iz odsečaka listova *C. erythraea* nakon 28 dana: a) somatski embrioni formirani na BM3, na svetlosti; b) organogene globule formirane na BM4, na svetlosti; c) kompletno razvijen somatski embrion na BM5, na svetlosti; d) adventivni pupoljak i organogene globule formirani na BM6, na svetlosti; e) somatski embrioni formirani na BM6, u mraku; f) somatski embrioni na kotiledonarnom stadijumu razvića formirani na BM6, u mraku; se – somatski embrion; og – organogena globula; ap – adventivni pupoljak; kse – somatski embrioni na kotiledonarnom stadijumu razvića

Adventivni pupoljci su se obrazovali na eksplantatima gajenim na svetlosti nakon 18 dana od početka eksperimenta. Osim adventivnih pupoljaka uočen je veliki broj organogenih globula (Slika 10d, 13). Nakon 28 dana od početka eksperimenta najveći broj pupoljaka je formiran na BM5, dok se na BM1, sa niskom koncentracijom (0,01 mg/l) CPPU, pupoljci nisu obrazovali (Tabela 13).

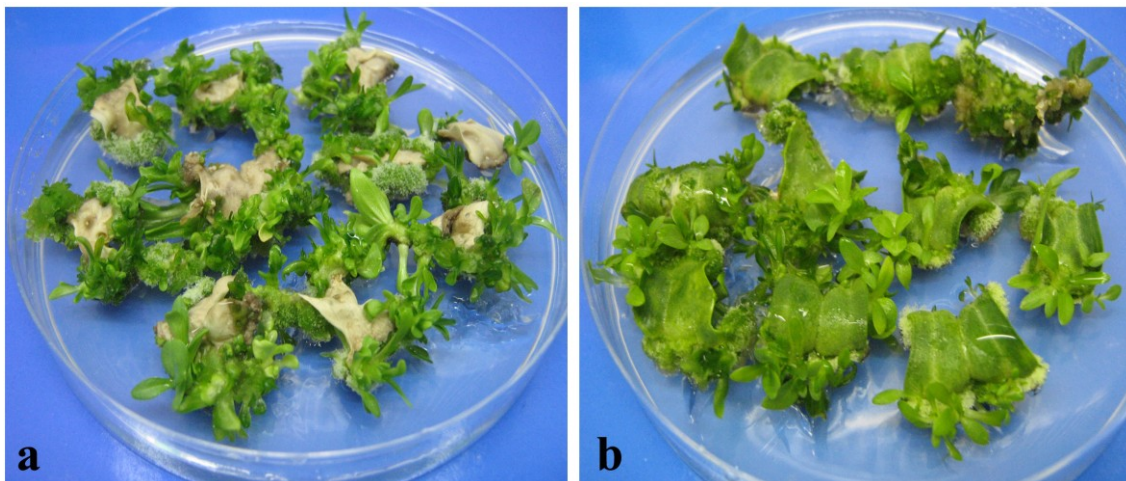


**Slika 13.** Formiranje adventivnih pupoljaka na odsečcima listova gajenim na svetlosti: a) organogene globule formirane na BM6, nakon 21 dana ; b) adventivni pupoljci formirani na BM4, nakon 28 dana; c) adventivni pupoljci formirani na BM5, nakon 28 dana; d) adventivni pupoljci formirani na BM6, nakon mesec dana; og – organogena globula; ap – adventivni pupoljak.



## 4.2. Regeneracija i aklimatizacija biljaka *C. erythraea*

U cilju ispitivanja daljeg razvoja adventivnih pupoljaka i somatskih embriona, kulture su prebačene na  $\frac{1}{2}$  BM hranljivu podlogu. Pri produženom trajanju subkulture uočeno je da se broj pupoljaka povećava. Najefikasnija regeneracija pupoljaka dobijena je na odsećcima listova koji su gajeni na BM5 hranljivoj podlozi tokom 28 dana, a zatim prebačeni na  $\frac{1}{2}$  BM hranljivu podlogu (**Slika 14**).



**Slika 14.** Formiranje adventivnih pupoljaka na odsećcima listova gajenim na svetlosti: a) odsećci listova koji su gajeni na BM5, tokom 28 dana na svetlosti, pa zatim prebačeni na  $\frac{1}{2}$  BM; b) odsećci listova koji su gajeni na BM5, tokom 28 dana u mraku, pa zatim prebačeni na  $\frac{1}{2}$  BM.

Za ožiljavanje i aklimatizaciju birani su dobro razvijeni pupoljci sa eksplantata koji su prebačeni na  $\frac{1}{2}$  BM hranljivu podlogu. Regenerisane biljke su prebacivane na  $\frac{1}{2}$  BM hranljivu podlogu, gde je dolazilo do spontanog ožiljavanja.

Ožiljene biljke su presađene u komercijalni supstrat i aklimatizovane u stakleniku (**Slika 15**). Ukupan procenat aklimatizacije iznosio je 96%. Regenerisane biljke u uslovima *in vitro* kulture, gajene na  $\frac{1}{2}$  BM hranljivoj podlozi, kao i regeneranti aklimatizovani u staklari su cvetali (**Slika 15c**).

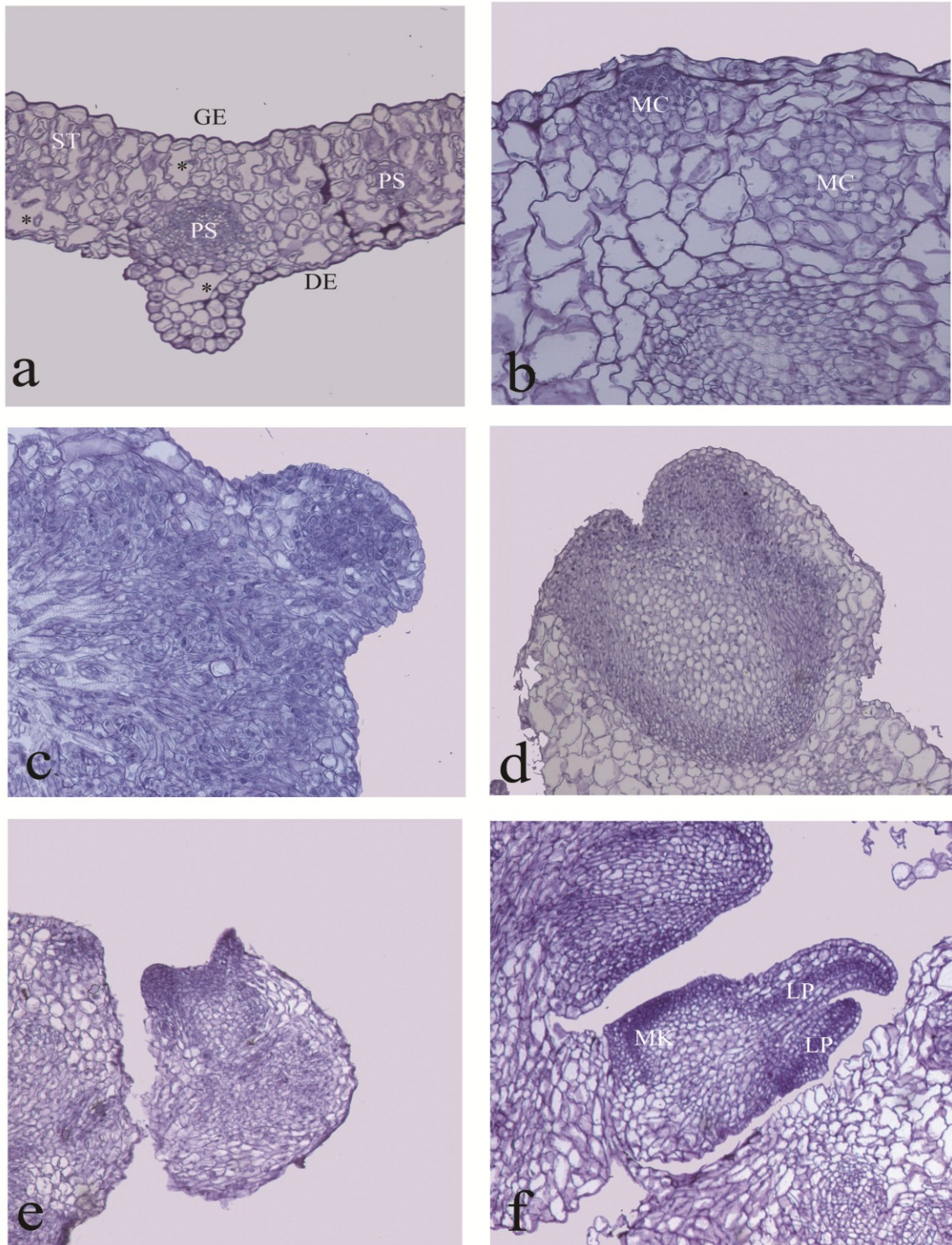


**Slika 15.** Aklimatizacija *in vitro* regenerisanih biljaka *C.erythraea*: a) regenerisane biljke u kulturi; b) ožiljene biljke; c) aklimatizovane biljke u staklari.



### 4.3. Anatomska istraživanja morfogeneze *in vitro* kičice

U cilju određivanja porekla somatskih embriona i adventivnih pupoljaka iz odsečaka listova kičice urađena su anatomska istraživanja procesa *in vitro* morfogeneze primenom tehnike svetlosne mikroskopije. Anatomija razvojnih stadijuma somatskih embriona i adventivnih pupoljaka je praćena kod odsečaka listova koji su gajeni na BM, BM1 i BM6 hranljivim podlogama, na svetlosti. Za anatomska istraživanja su fiksirani odsecci listova u različitim vremenskim intervalima od početka eksperimenta tj. nakon 0, 3, 5, 7, 10, 15, 20 i 28 dana. Na uzdužnom preseku lista uočava se tipična građa ovog vegetativnog organa, donji (DE) i gornji epidermis (GE), palisadno (PT) i sunderasto tkivo (ST) i provodni snopići (PS). U okviru ćelija donjeg epidermisa uočavaju se i stome (S). Ono što je specifično za građu lista kičice koja se gaji u uslovima *in vitro* je prisustvo velikih intercelulara između ćelija palisadnog i sunderastog tkiva (**Slika 16a**). Posle sedam dana gajenja na hranljivoj podlozi sa regulatorima rasteња diferenciraju se meristemski centri deobama ćelija subepidermalnih slojeva lista (**Slika 16b**). Oni su izgrađeni od malih izodijametričnih ćelija sa gustom citoplazmom. Kako je proces SE u iz odsečaka listova kičice asinhron, na serijskim presecima eksplantata, posle 14 dana od početka eksperimenta mogu se pored mnoštva meristemskih centara uočiti i prve proembriogene strukture (**Slika 16c**). One verovatno nastaju kao rezultat antiklinih ćelijskih deoba. Na eksplantatima iste starosti se mogu uočiti i somatski embrioni na globularnom stadijumu razvića, izgrađeni od izodijametričnih ćelija, oivičenih slojem protoderma (**Slika 16d**). Daljom proliferacijom ćelija duž ose embriona dolazi do uspostavljanja razvojnog stadijuma sa izraženijom polarnošću - somatskog embriona na srcastom stadijumu razvića (**Slika 16e**). Nakon 28 dana gajenja na induktivnoj hranljivoj podlozi, struktura početnog eksplantata je delimično dezintegrisana, a na presecima mogu se uočiti vakuolizirane ćelije i veliki intercelulari, a na površini pored brojnih meristemskih centara se javljaju i somatski embrioni na svim razvojnim stadijumima, pa i oni kompletno razvijeni.

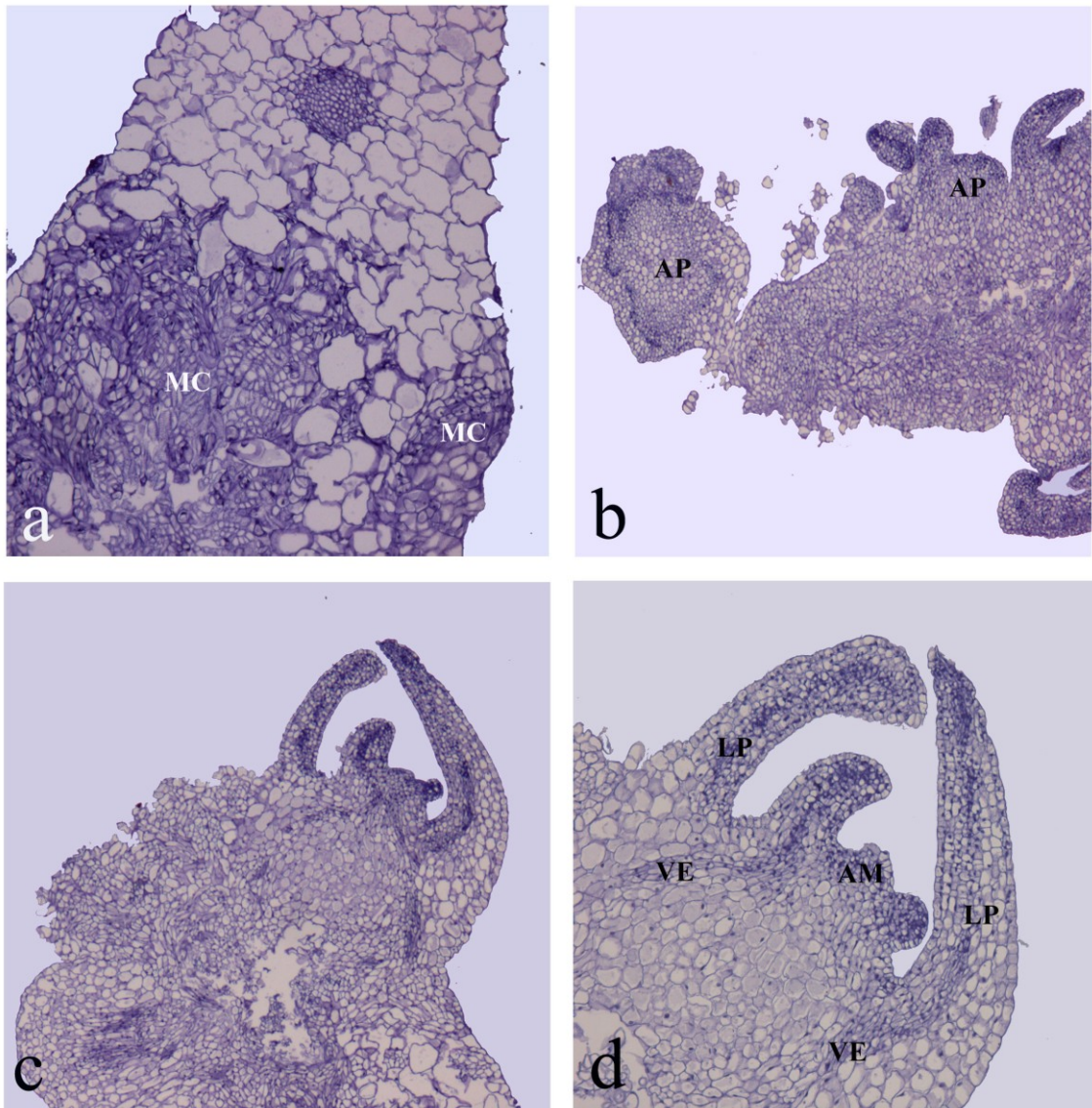


**Slika 16.** Proces SE iz odsečaka listova kičice na BM6 hranljivoj podlozi: a) uzdužni presek odsečka lista kičice sa jasno uočljivim donjim (DE) i gornjim epidermisom (GE), palisadnim (PT) i sponderastim (ST) tkivom i provodnim snopićima (PS), \*-intercelulari; b) meristemski centri (MC) formirani u subepidermalnom sloju lista; c) proembriogena nodula; d) globularni somatski embrion; e) somatski embrion na srcastom stadijumu razvića; f) kompletno diferenciran somatski embrion sa apikalnim meristemom, lisnim primordijama (LP) i meristemom korena (MK).

Somatski embrion na kotiledonarnom stadijumu razvića kičice ima dobro razvijen apikalni meristem, lisne primordije i meristem korena (**Slika 16f**). Somatski embrioni su poreklom od subepidermalnih ćelija lista i na kraju svog formiranja nemaju nikakvu vaskularnu vezu sa početnim eksplantatom. Na osnovu toga je pretpostavljeno da je SE iz odsečaka listova kičice indirektna, a da somatski embrioni imaju višećelijsko poreklo.

Anatomskim analizama je potvrđeno da se pored procesa SE, odvijao i proces organogeneze iz odsečaka listova kičice. Posle 10-15 dana gajenja odsečaka listova na induktivnim hranljivim podlogama, na uzdužnom preseku u regionu sunderastog i palisadnog tkiva mogu se uočiti brojne izodijametrične ćelije bogate citoplazmom koje se intezivno dele i formiraju kalusno tkivo. Kao rezultat ovih aktivnosti nastaju brojni meristemski centri, neravnomerno raspoređeni po mezofilu lista i subepidermalnom tkivu (**Slika 17a**). Njihovom daljom diferencijacijom formiraju se brojne inicijale adventivnih pupoljaka (**Slika 17b**). Posle 20 dana gajenja na induktivnoj hranljivoj podlozi primarna struktura eksplantata je dezintegrisana zbog razvića i rasta kalusa. Kalus grade visoko vakuolizirane ćelije poreklom od ćelija mezofila lista. Na njegovoj periferiji uočavaju se diferencirani adventivni pupoljci, koji su vaskularnim vezama i dalje spojeni sa vaskularnim elementima početnog eksplantata (**Slika 17c**). Kompletno razvijen adventivni pupoljak ima apikalni meristem, brojne lisne primordije i vaskularne elemente (**Slika 17d**). Adventivni pupoljci se formiraju diferencijacijom meristemskih ćelija kalusnog tkiva poreklom od mezofilnih ćelija lista.





**Slika 17.** Proces organogeneze iz odsečaka listova kičice gajenih na BM6 hranljivoj podlozi na svetlosti: a) uzdužni presek lista sa brojnim meristemskim centrima (MC), posle 14 dana; b) deo odsečka lista sa brojnim inicijalama adventivnih pupoljaka (AP); c) i d) detalj adventivnog pupoljka sa razvijenim apikalnim meristemom (AM), lisnim primordijama (LP) i vaskularnim elementima (VE).

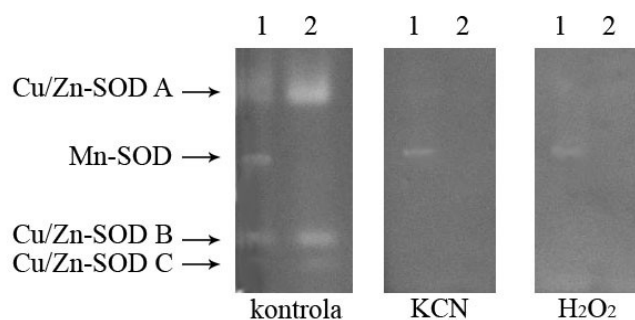
#### **4.4. Aktivnost antioksidativnih enzima tokom procesa morfogeneze *in vitro* kičice**

Za analizu antioksidativnih enzima korišćeni su odsecci listova gajeni na BM, BM1 i BM6 hranljivim podlogama, na svetlosti ili u mraku. Kao kontrola korišćeni su intaktni listovi kičice. Praćena je dinamika promene aktivnosti antioksidativnih enzima tokom prve 4 nedelje (svakih 7 dana) procesa morfogeneze *in vitro*. Aktivnost antioksidativnih enzima je ispitana i u listovima regeneranata dobijenih procesom organogeneze.

##### **4.4.1. Aktivnost superoksid dismutaza tokom procesa morfogeneze *in vitro* kičice**

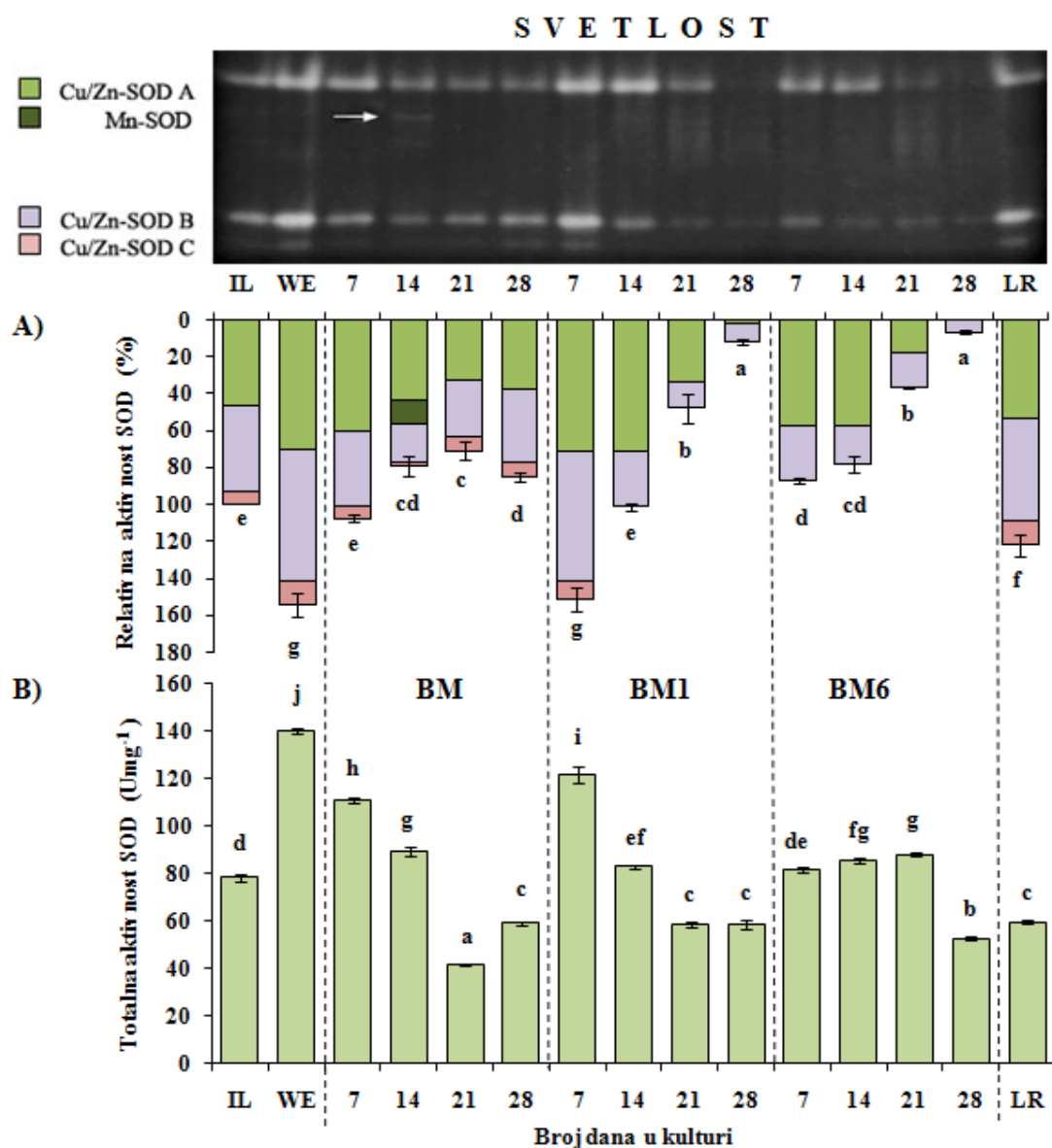
U intaktnim listovima, koji su služili kao izvor eksplantata, i u listovima regeneranata kičice gajenih *in vitro* detektovane su tri izoforme Cu/Zn-SOD, označene kao A, B i C (**Slika 18**). Različite izoforme superoksid dismutaze su identifikovane tako što su gelovi sa identičnim uzorcima pre bojenja inkubirani u kontrolnom kalijum fosfatnom puferu ili u prisustvu inhibitora koji su specifični za pojedine SOD izoforme. U prisustvu vodonik-peroksida koji inhibira Cu/Zn-SOD i Fe-SOD izoforme bila je aktivna jedna izoforma koja se javila samo na jednom tretmanu tokom morfogeneze *in vitro* na svetlosti, 14. dana na BM hranljivoj podlozi (**Slike 18 i 19**). Takođe je ova izoforma aktivna u prisustvu kalijum cijanida koji inhibira Cu/Zn-SOD izoforme. Ovi rezultati ukazuju da se radi o Mn-SOD izoformi. U kalijum fosfatnom puferu koji je služio kao kontrola bile su aktivne sve izoforme. Fe-SOD izoforma nije detektovana ni u jednom uzorku tokom morfogeneze *in vitro* kičice.

Do povećanja kumulativne aktivnosti Cu/Zn-SOD u odnosu na kontrolu došlo je nakon povređivanja listova kičice radi pripreme eksplantata za postavljanje na hranljive podloge za ispitivanje morfogeneze, tako što je povećana aktivnost izoformi A, B i C. Na osnovu dobijenih rezultata spektrofotometrijske kvantifikacije aktivnosti SOD (**Slike 19B i 20B**) takođe je uočeno povećanje ukupne aktivnosti SOD u eksplantatima ( $140,26 \pm 1,10 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) usled delovanja mehaničkog stresa u odnosu na kontrolne (intaktne) listove izdanaka ( $78,19 \pm 1,40 \text{ mmolmin}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ).

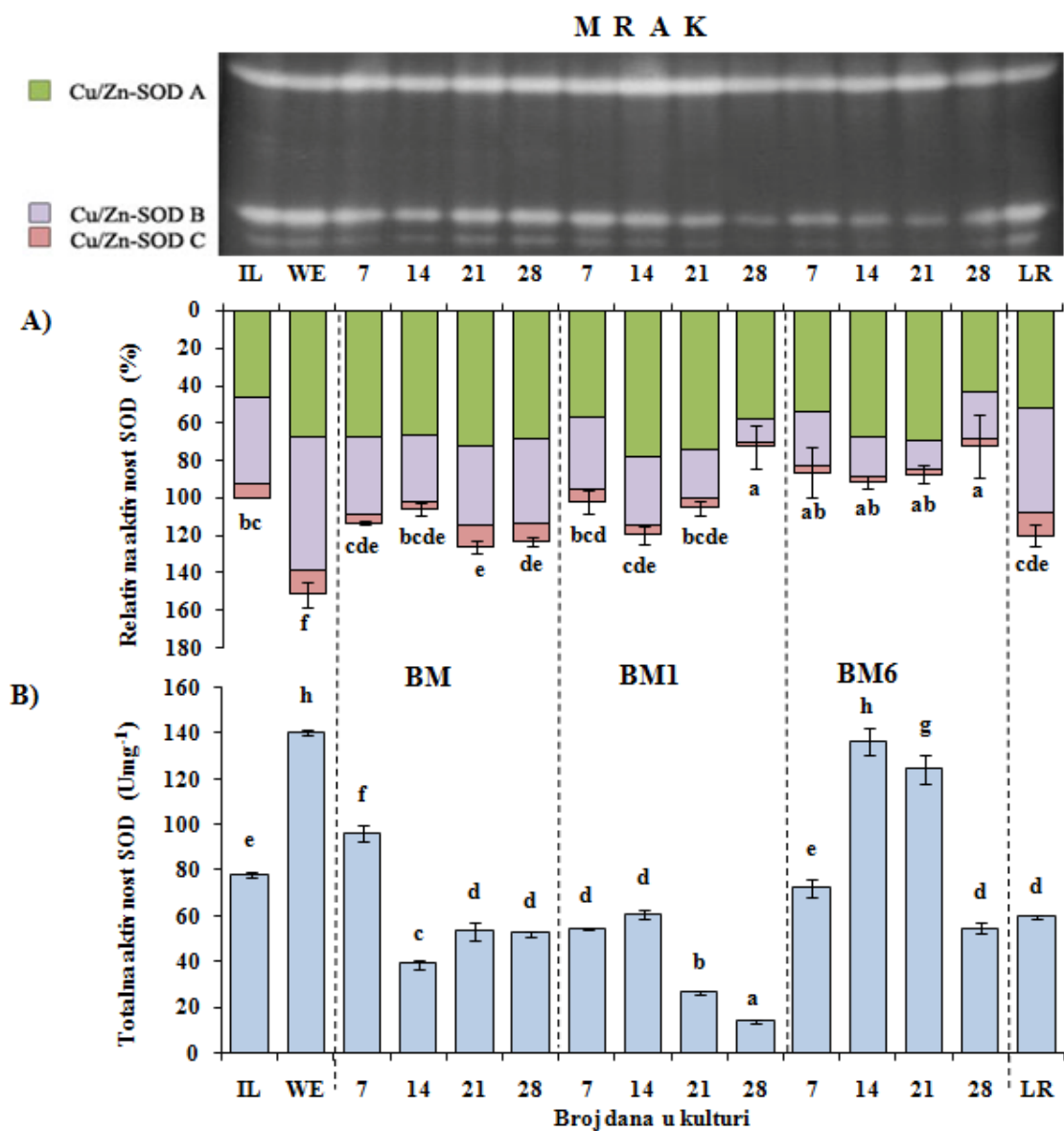


**Slika 18.** Razdvajanje SOD izoformi: 1 - odsečki listova kičice gajeni na BM tokom 14 dana; 2 - odsečki listova kičice gajeni na BM1 tokom 7 dana;

Na BM hranljivoj podlozi kumulativna aktivnost Cu/ZnSOD je uglavnom bila nepromenjena u odnosu na kontrolnu vrednost, mada je 14. i 21. dana na svetlosti došlo do pada njene aktivnosti (**Slike 19A i 20A**). Tokom morfogeneze na svetlosti tokom 28 dana došlo je do smanjenja kumulativne aktivnosti Cu/Zn-SOD na BM1 i BM6 hranljivim podlogama, a smanjenje je bilo posebno izraženo 21. i 28. dana od početka eksperimenta (**Slika 19A**). Cu/Zn-SOD B izoforma je zastupljena kod svih uzoraka na svetlosti, iako slabije izražena na BM1 i BM6 hranljivim podlogama dok su zastupljenosti Cu/Zn-SOD A i Cu/Zn-SOD C varirale u zavisnosti od tretmana (**Slika 19A**). Aktivnost Cu/Zn-SOD A se smanjivala nakon 21. dana do potpunog odsustva aktivnosti ove izoforme 28. dana na BM1 i BM6 hranljivim podlogama. Cu/Zn-SOD C je imala najmanju aktivnost u odnosu na ostale aktivne izoforme Cu/Zn-SOD. Kod eksplantata gajenih i na BM1 i BM6 hranljivim podlogama aktivnost Cu/Zn-SOD C u potpunosti odsustvuje, osim 7. dana na BM1 hranljivoj podlozi (**Slika 19A**). Tokom morfogeneze u mraku takođe je došlo do smanjenja kumulativne aktivnosti SOD 28. dana od početka eksperimenta na BM1 i BM6 hranljivim podlogama pri čemu je aktivnost sve tri Cu/Zn-SOD izoforme bila prisutna na svim tretmanima. U listovima regeneranata su detektovane sve izoforme.



**Slika 19.** Aktivnost SOD tokom morfogeneze iz odsečaka listova kičice gajenih na svetlosti: A) Relativna aktivnost SOD određena gel testom. Za nativnu elektroforezu korišćeno je 60  $\mu\text{g}$  ukupnih proteina. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijski i normalizovana u odnosu na kontrolu, koja je uzeta kao 100%; B) Totalna (ukupna) aktivnost SOD je određena spektrofotometrijski. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. Oznake istog slova označavaju da nema statistički značajnih razlika (za  $p \leq 0,05$ ) između srednjih vrednosti; IL – intaktni listovi kičice; WE – sveže izolovani odsecci listova koji nisu gajeni na hranljivoj podlozi; LR – listovi regeneranata; BM, BM1, BM6 – hranljive podloge za ispitivanje morfogeneze.



**Slika 20.** Aktivnost SOD tokom morfogeneze iz odsečaka listova kičice gajenih u mraku: A) Relativna aktivnost SOD određena gel testom. Za nativnu elektroforezu korišćeno je 60  $\mu$ g ukupnih proteina. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijski i normalizovana u odnosu na kontrolu, koja je uzeta kao 100%; B) Totalna (ukupna) aktivnost SOD je određena spektrofotometrijski. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. Oznake istog slova označavaju da nema statistički značajnih razlika (za  $p \leq 0,05$ ) između srednjih vrednosti; IL – intaktni listovi kičice; WE – sveže izolovani odsečki listova koji nisu gajeni na hranljivoj podlozi; LR – listovi regeneranata; BM, BM1, BM6 – hranljive podloge za ispitivanje morfogeneze.

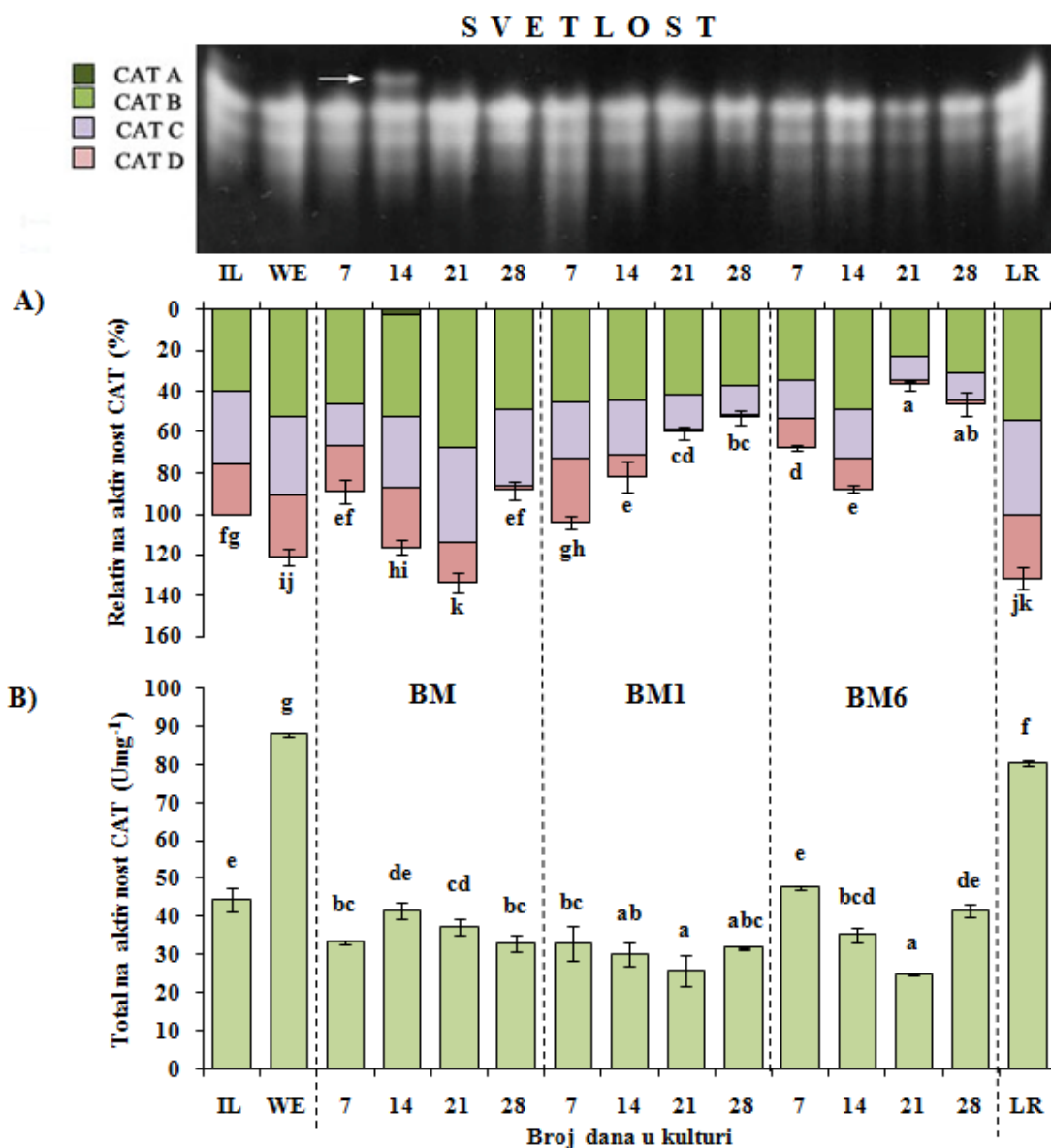


#### 4.4.2. Aktivnost katalaza tokom morfogeneze *in vitro* kičice

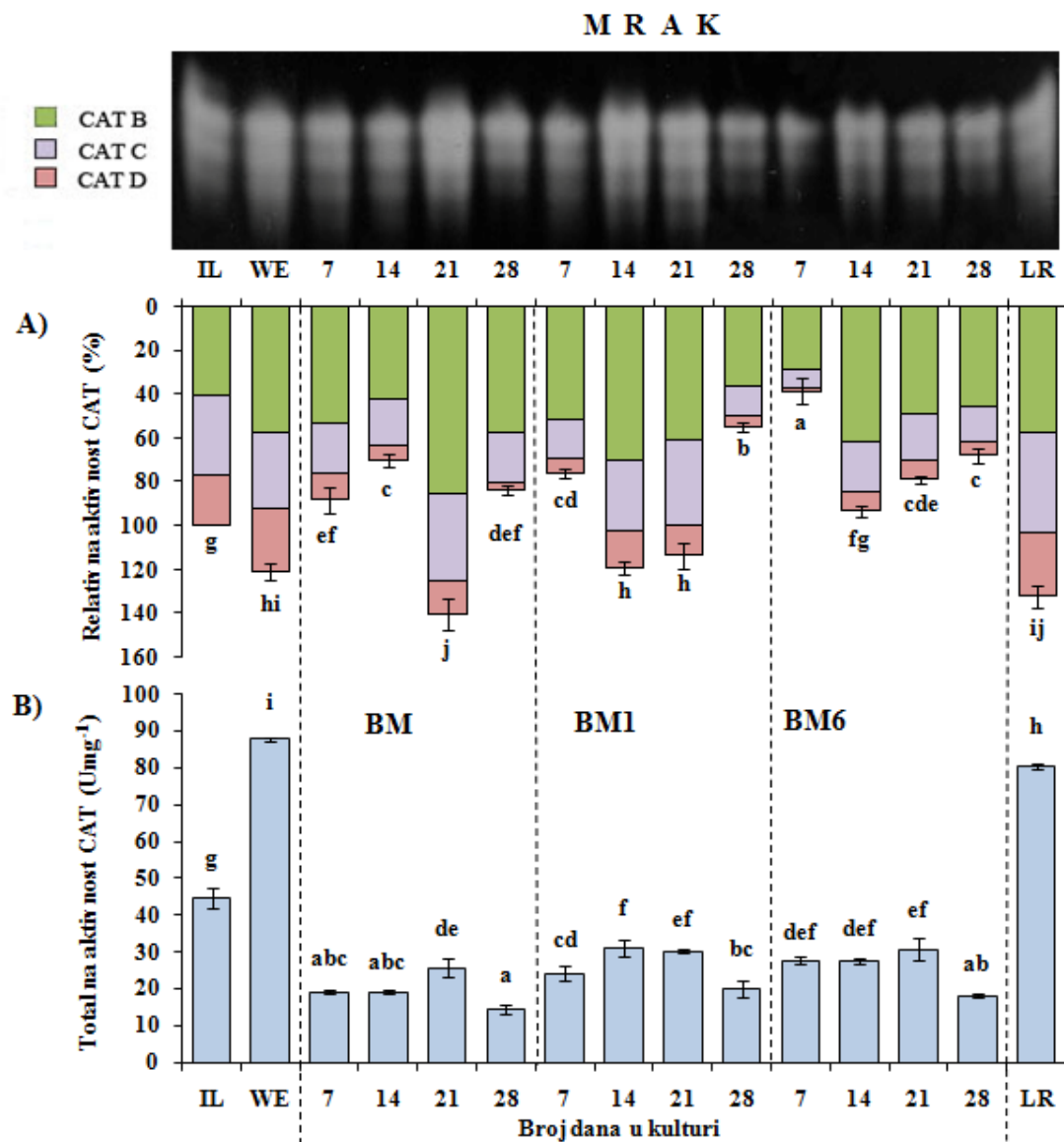
Aktivnost 3 glavne izoforme CAT (CAT B, C i D) detektovana je u intaktnim listovima kičice i listovima regeneranata, kao i tokom morfogeneze na svetlosti i u mraku, koje su inače prisutne kod svih uzoraka, ali se aktivnost ovih izoformi menjala tokom morfogeneze (**Slike 21A i 22A**). Osim ovih katalaznih izoformi kod pojedinih uzoraka na svetlosti je detektovano više bliskih izoformi CAT sa većom elektroforetskom mobilnošću koje nisu mogle biti razdvojene. CAT A izoforma se mogla uočiti samo kod odsečaka listova gajenih na BM hranljivoj podlozi, na svetlosti, 14. dana od početka eksperimenta.

Visoka kumulativna aktivnost CAT je zabeležena u listovima regeneranata, kao i povišena aktivnost CAT kod sveže izolovanih odsečaka listova u odnosu na kontrolne intaktne listove. Rezultati spektrofotometrijske kvantifikacije ukupne aktivnosti CAT (**Slike 21B i 22B**) su takođe pokazali da je nakon delovanja mehaničkog stresa na intaktne listove ukupna aktivnost enzima udvostručena ( $87,8 \pm 0,54 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolnu vrednost ( $44,63 \pm 2,94 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). Visoka vrednost ukupne aktivnosti CAT je izmerena u listovima regeneranata ( $80,36 \pm 0,79 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). Tokom morfogeneze kumulativna aktivnost se uglavnom smanjivala u odnosu na kontrolnu vrednost, mada su kod pojedinih uzoraka detektovana povećanja. Najviša kumulativna aktivnost CAT je uočena 21. dana na BM hranljivoj podlozi, i na svetlosti i u mraku, a ovom povećanju je prethodio pad aktivnosti (**Slike 21A i 22A**). Tokom kalusogeneze na BM1 hranljivoj podlozi, na svetlosti, smanjena je kumulativna aktivnost CAT, uz smanjenje aktivnosti dve izoforme CAT C i D, dok je aktivnost CAT B bila nepromenjena (**Slika 21A**). Kod eksplantata gajenih na istoj hranljivoj podlozi, u mraku, aktivnost CAT je bila smanjena 7. dana, a zatim povećana 14. i 21. dana od početka eksperimenta (**Slika 22A**). Kod eksplantata gajenih na BM6 hranljivoj podlozi, na svetlosti ili u mraku, nakon 14 dana došlo je do povećanja kumulativne aktivnosti CAT, koje je bilo praćeno padom aktivnosti tokom daljeg procesa morfogeneze (**Slike 21A i 22A**).

Tokom morfogeneze na svim hranljivim podlogama detektovano je smanjenje ukupne aktivnosti CAT u odnosu na kontrolnu vrednost (**Slike 21B i 22B**).



**Slika 21.** Aktivnost CAT tokom morfogeneze iz odsečaka listova kičice gajenih na svetlosti: A) Relativna aktivnost CAT određena gel testom. Za nativnu elektroforezu korišćeno je 5  $\mu$ g ukupnih proteina. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijski i normalizovana u odnosu na kontrolu, koja je uzeta kao 100%; B) Totalna (ukupna) aktivnost CAT je određena spektrofotometrijski. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. Oznake istog slova označavaju da nema statistički značajnih razlika (za  $p \leq 0,05$ ) između srednjih vrednosti; IL – intaktni listovi kičice; WE – sveže izolovani odsečki listova koji nisu gajeni na hranljivoj podlozi; LR – listovi regeneranata; BM, BM1, BM6 – hranljive podloge za ispitivanje morfogeneze.



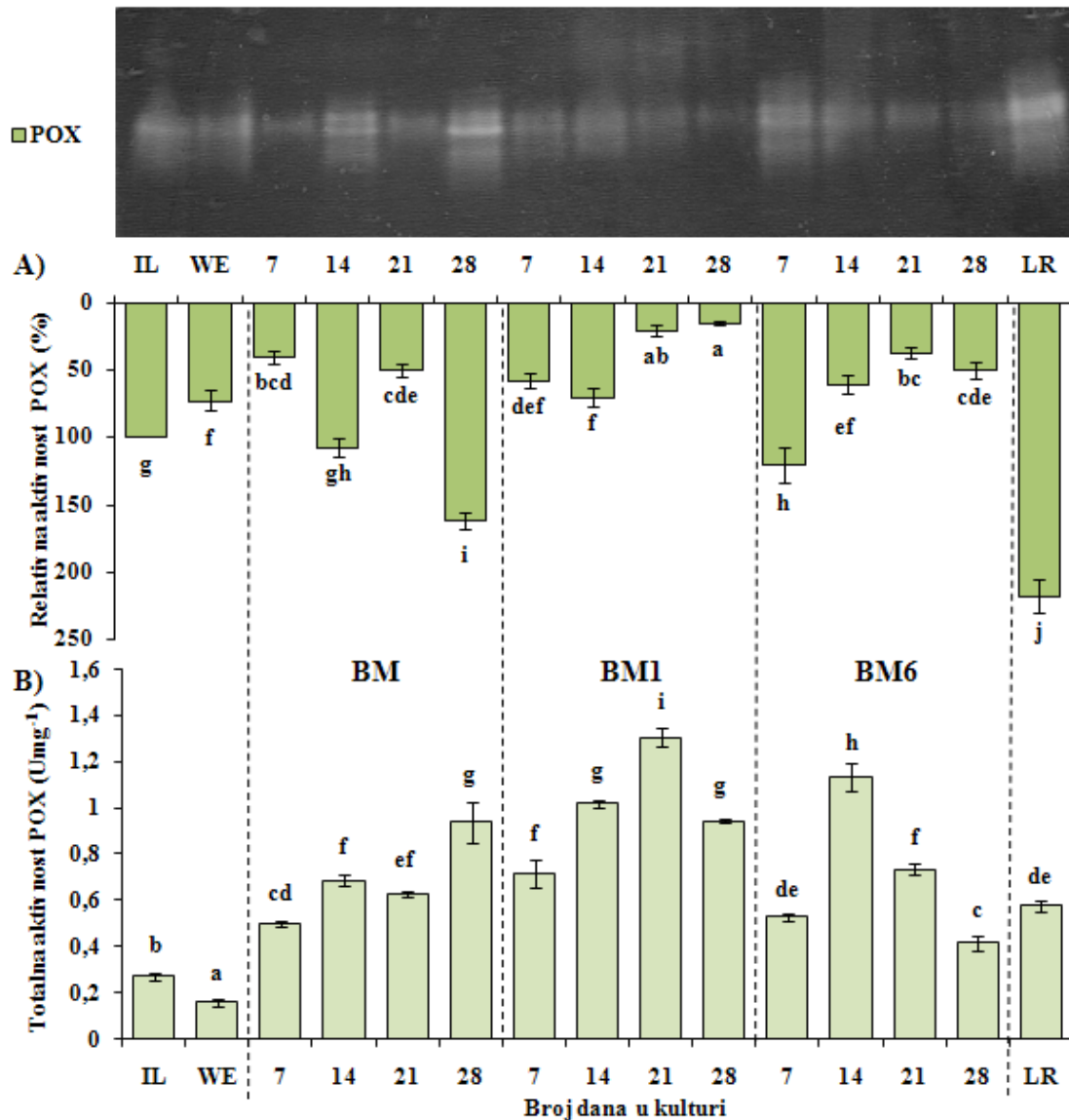
**Slika 22.** Aktivnost CAT tokom morfogeneze iz odsečaka listova kičice gajenih u mraku: A) Relativna aktivnost CAT određena gel testom. Za nativnu elektroforezu korišćeno je 5  $\mu\text{g}$  ukupnih proteina. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijski i normalizovana u odnosu na kontrolu, koja je uzeta kao 100%; B) Totalna ( ukupna) aktivnost CAT određena spektrofotometrijski. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. Oznake istog slova označavaju da nema statistički značajnih razlika (za  $p \leq 0,05$ ) između srednjih vrednosti; IL – intaktni listovi kičice; WE – sveže izolovani odsecci listova koji nisu gajeni na hranljivoj podlozi; LR – listovi regeneranata; BM, BM1, BM6 – hranljive podloge za ispitivanje morfogeneze.

#### 4.4.3. Aktivnost peroksidaza tokom morfogeneze *in vitro* kičice

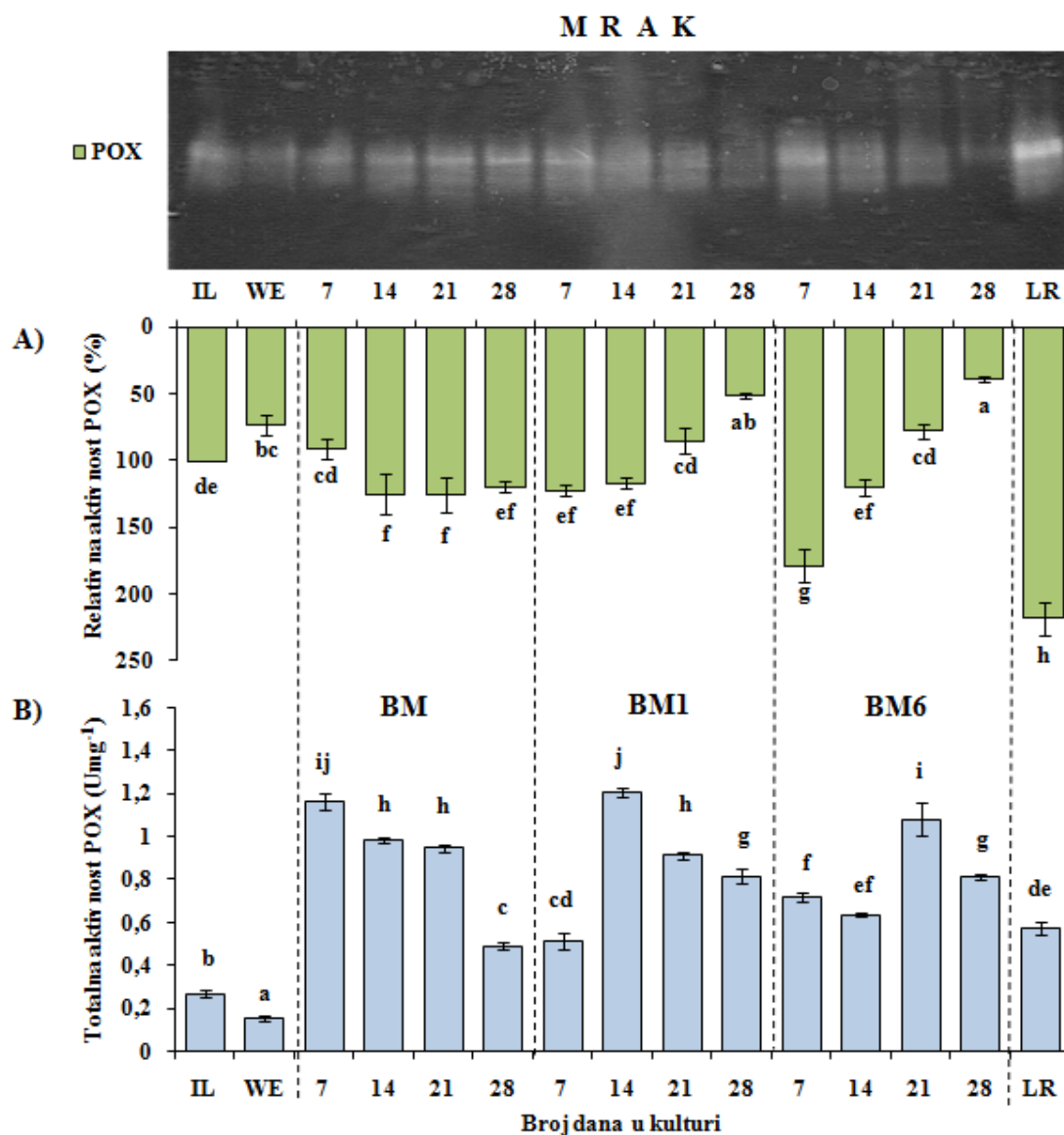
Dokazivanjem aktivnosti POX u gelu nije bilo moguće razdvojiti pojedinačne izoforme POX kada je kao supstrat korišćen 4-hloro- $\alpha$ -naftol, tako da je kod većine uzoraka uočeno više bliskih traka aktivnosti POX izoformi koje se nisu razdvojile (**Slike 23A i 24A**). Samo su kod eksplantata gajenih na BM hranljivoj podlozi tokom 14. i 28. dana na svetlosti detektovane diskretne POX izoforme bliskih elektroforetskih mobilnosti (**Slika 23A**). Kod eksplantata gajenih na BM hranljivoj podlozi uočen je porast kumulativne aktivnosti POX tokom organogeneze, a najviša vrednost je detektovana 28. dana od početka eksperimenta, dok je na BM1 i BM6 detektovano smanjenje kumulativne aktivnosti POX tokom morfogeneze. Ovi trendovi su uočeni kako tokom morfogeneze koja se odvijala na svetlosti, tako i kod morfogeneze u mraku (**Slike 23A i 24A**). Pokazalo se da je gel testom teško detektovati aktivnost POX kod kičice, jer posle bojenja sa najčešće korišćenim POX supstratima, gvajakolom i pirogalolom, izoforme POX nisu uočene na gelu. S obzirom na to, u ovom istraživanju smo se oslonili na rezultate spektrofometrijske kvantifikacije POX. Tokom morfogeneze iz odsečaka listova kičice ukupna aktivnost POX je bila povećana (**Slike 23B, 24B**).

Rezultati spektrofometrijske i kvantifikacije na gelu peroksidaza su pokazali da je nakon povređivanja listova kičice radi pripreme eksplantata došlo do smanjenja aktivnosti POX u odsečcima listova ( $0,16 \pm 0,02 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) u odnosu na kontrolu ( $0,27 \pm 0,02 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ), što je i najniža izmerena vrednost POX. Ukupna aktivnost POX bila statistički značajno veća u odnosu na kontrolu i u listovima regeneranata ( $0,58 \pm 0,03 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ), kao i tokom morfogeneze. Najveća ukupna aktivnost POX ( $1,31 \pm 0,3 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) je izmerena 21. dana na BM1 hranljivoj podlozi, na svetlosti, odnosno 14. dana na istoj hranljivoj podlozi u mraku ( $1,2 \pm 0,02 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ).

## S V E T L O S T



**Slika 23.** Aktivnost POX tokom morfogeneze iz odsečaka listova kičice gajenih na svetlosti: A) Relativna aktivnost POX određena gel testom. Za nativnu elektroforezu korišćeno je 60  $\mu\text{g}$  ukupnih proteina. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijski i normalizovana u odnosu na kontrolu, koja je uzeta kao 100%; B) Totalna (ukupna) aktivnost POX je određena spektrofotometrijski. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. Oznake istog slova označavaju da nema statistički značajnih razlika (za  $p \leq 0,05$ ) između srednjih vrednosti; IL – intaktni listovi kičice; WE – sveže izolovani odsecci listova koji nisu gajeni na hranljivoj podlozi; LR – listovi regeneranata; BM, BM1, BM6 – hranljive podloge za ispitivanje morfogeneze.

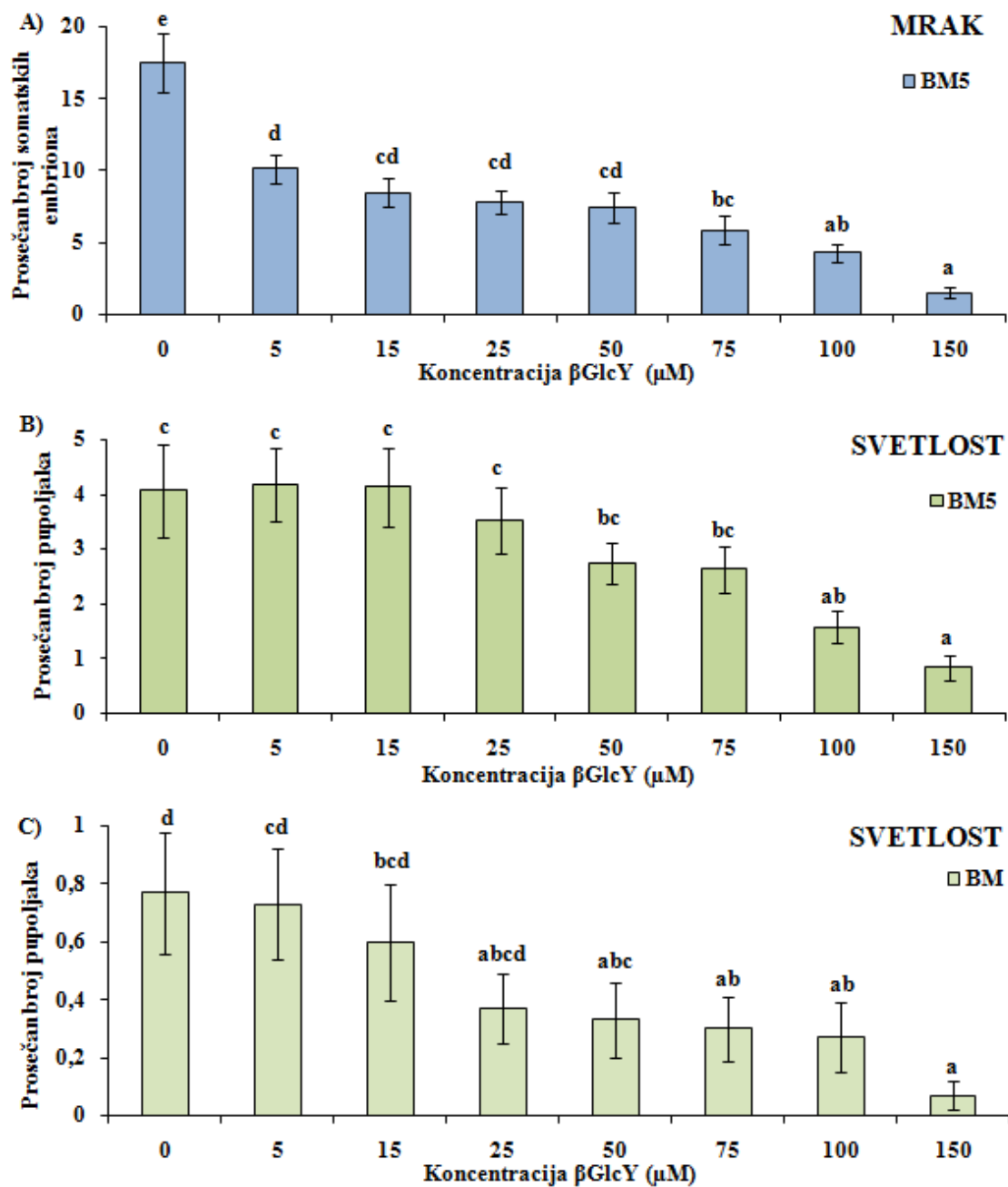


**Slika 24.** Aktivnost POX tokom morfogeneze iz odsečaka listova kičice gajenih u mraku: A) Relativna aktivnost POX određena gel testom. Za nativnu elektroforezu korišćeno je 60  $\mu\text{g}$  ukupnih proteina. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijski i normalizovana u odnosu na kontrolu, koja je uzeta kao 100%. B) Totalna (ukupna) aktivnost POX je određena spektrofotometrijski. Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. Oznake istog slova označavaju da nema statistički značajnih razlika (za  $p \leq 0,05$ ) između srednjih vrednosti; IL – intaktni listovi kičice; WE – sveže izolovani odsečki listova koji nisu gajeni na hranljivoj podlozi; LR – listovi regeneranata; BM, BM1, BM6 – hranljive podloge za ispitivanje morfogeneze.

## 4.5. Ispitivanje uloge AGP u procesu morfogeneze *in vitro* kičice

### 4.5.1. Efekat $\beta$ GlcY na proces morfogeneze *in vitro* kičice

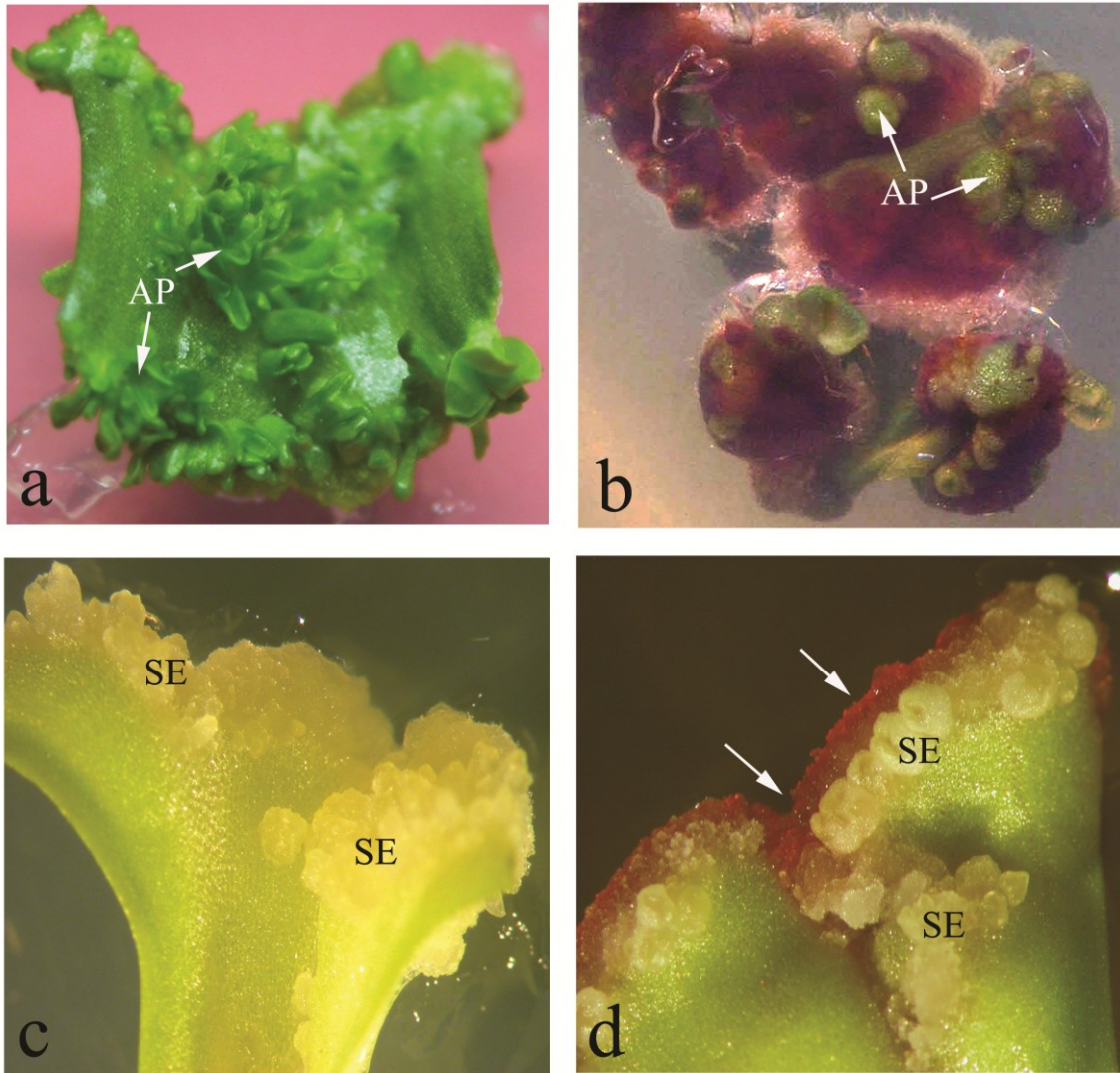
Efekat  $\beta$ GlcY na proces morfogeneze *in vitro* iz odsečaka listova kičice je istražen dodavanjem  $\beta$ GlcY u BM i BM5 hranljive podloge, u koncentracijama od 5, 15, 25, 50, 75, 100 ili 150  $\mu$ M. Dodavanjem  $\beta$ GlcY u BM hranljivu podlogu, na kojoj je frekvencija pojave pupoljaka bila 20% (**Tabela 13**), na svetlosti je istražen njegov efekat na proces direktne organogeneze pupoljaka. Na BM5 hranljivoj podlozi na svetlosti najveći procenat eksplantata (45%) formira adventivne pupoljke putem indirektno organogeneze, tako da je efekat  $\beta$ GlcY na proces indirektno organogeneze pupoljaka praćen dodavanjem  $\beta$ GlcY u BM5 hranljive podloge i daljim gajenjem odsečaka listova na svetlosti. S obzirom na to da je kod eksplantata gajenih na BM5 hranljivoj podlozi na svetlosti detektovana istovremena pojava ISE i indirektno organogeneze pupoljaka, radi istraživanja efekta  $\beta$ GlcY na proces ISE, koji se odvijao kod 70% eksplantata gajenih na BM5 hranljivoj podlozi u mraku (**Tabela 13**),  $\beta$ GlcY je dodavan u istu BM5 hranljivu podlogu. Sa porastom koncentracija  $\beta$ GlcY u hranljivoj podlozi detektovano je smanjenje broja somatskih embriona i adventivnih pupoljaka po eksplantatu (**Slika 25**).  $\beta$ -GlcY nije u istoj meri uticao na pomenute morfogenetske procese, jer je smanjenje broja somatskih embriona bilo izraženije u odnosu na smanjenje broja pupoljaka. Do statistički značajnog smanjenja broja adventivnih pupoljaka formiranih u procesu indirektno organogeneze na BM5 hranljivoj podlozi, na svetlosti, došlo je na hranljivim podlogama koje su sadržale  $\beta$ GlcY u koncentracijama višim od 50  $\mu$ M, pri čemu je na koncentraciji od 150  $\mu$ M  $\beta$ GlcY broj pupoljaka smanjen 4,9 puta u odnosu na broj pupoljaka na podlozi bez  $\beta$ GlcY. Proces direktne organogeneze je bio pod većim uticajem  $\beta$ GlcY: na najvišoj primenjenoj koncentraciji (150  $\mu$ M) broj pupoljaka bio je 11 puta manji u odnosu na podlogu bez  $\beta$ GlcY. Do statistički značajnog smanjenja broja somatskih embriona dolazi već na BM5Y5, a proces SE je skoro potpuno inhibiran na BM5Y150.



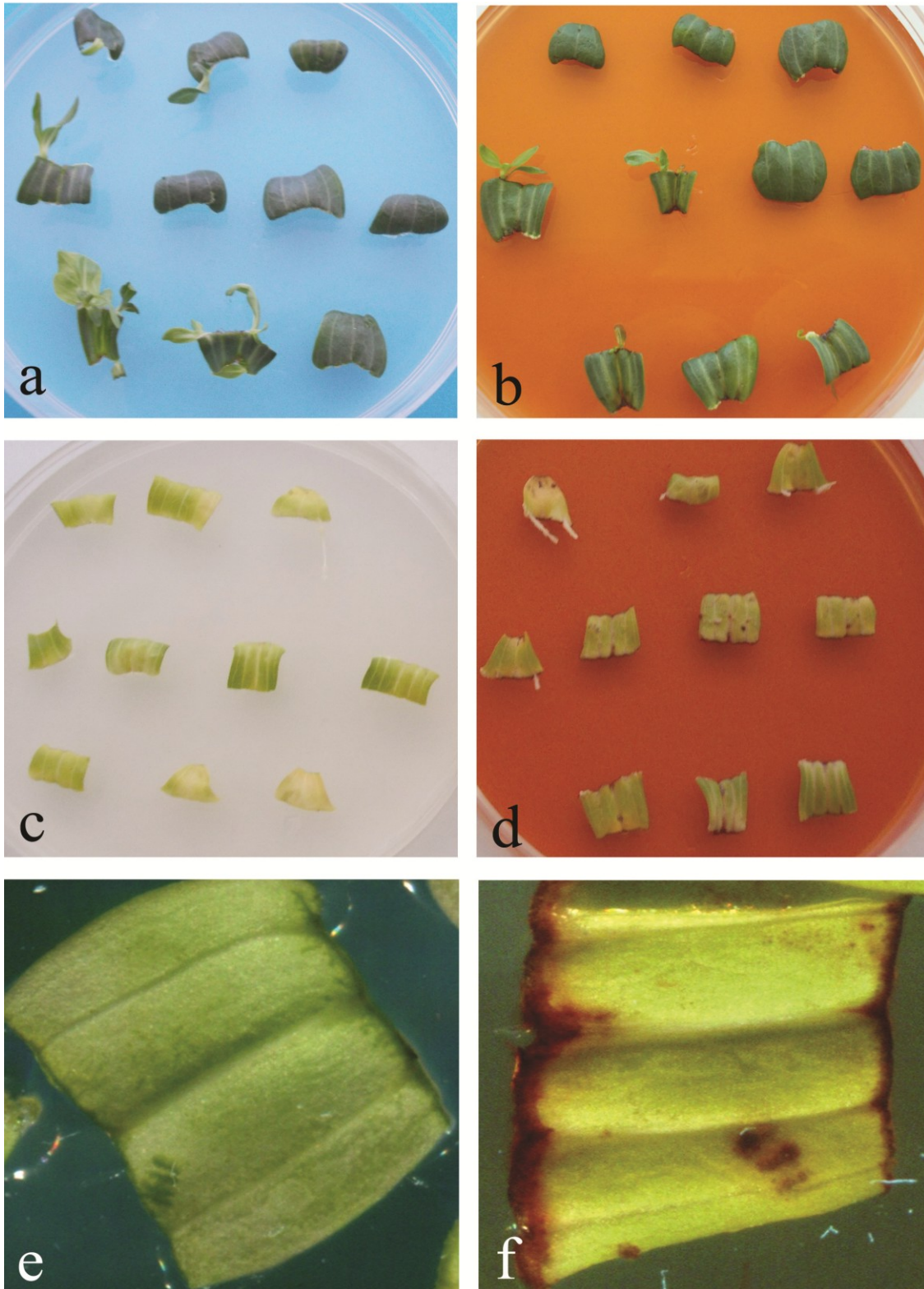
**Slika 25.** Efekat  $\beta$ GlcY na: A) formiranje somatskih embriona na BM5 hranljivoj podlozi, u mraku, nakon 28 dana; B) formiranje adventivnih pupoljaka putem indirektno organogeneze na BM5 hranljivoj podlozi, na svetlosti, nakon 28 dana; C) formiranje adventivnih pupoljaka putem direktno organogeneze na BM hranljivoj podlozi, na svetlosti, nakon 28 dana. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti t. Oznake istog slova u okviru istog tretmana označavaju da nema statistički značajnih razlika (za  $p \leq 0,05$ ) između srednjih vrednosti.



Formiranje somatskih embriona u mraku bilo je ograničeno na regione eksplantata koji nisu bili u kontaktu sa podlogom koja je sadržala  $\beta$ GlcY, za razliku od zelenih adventivnih globula i pupoljaka koji su se formirali na svetlosti i u kontaktu sa podlogom koja je sadržala ovaj reagens. Dodavanje  $\beta$ GlcY u BM5 podlogu je dovelo do povećane pojave kalusa i formiranja rizogenog kalusa po obodu izolovanog eksplantata, naročito na svetlosti (**Slika 26b**). Nakon 28 dana od početka eksperimenta na hranljivim podlogama sa  $\beta$ GlcY mogla se uočiti crvena obojenost kalusa i oboda izolovanog eksplantata, što je ukazivalo na to da je  $\beta$ GlcY iz hranljive podloge difundovao u tkivo odsečka lista (**Slike 26b, 26d i 27f**). Može se primetiti da je crvena obojenost karakteristična za obod izolovanog eksplantata i kalus koji se na tim mestima formirao, dok se nije mogla uočiti na delovima lista gde nije bilo povrede. Na hranljivim podlogama BM i BM5 bez  $\beta$ GlcY, koje su služile kao kontrola, procesi SE i organogeneze su se odvijali nesmetano (**Slike 26a, 26c, 27a i 27c**).



**Slika 26.** Efekat  $\beta$ GlcY na proces morfogeneze iz odsečaka listova *C.erythraea* nakon 28 dana; a) SE i organogeneza u kontrolnim uslovima, na BM5 hranljivoj podlozi, na svetlosti; b) SE i organogeneza, na BM5Y75 hranljivoj podlozi, na svetlosti; c) SE u kontrolnim uslovima, na BM5 hranljivoj podlozi, u mraku; d) SE na BM5Y75, u mraku; SE – somatski embrión; AP – adventivni pupoljak



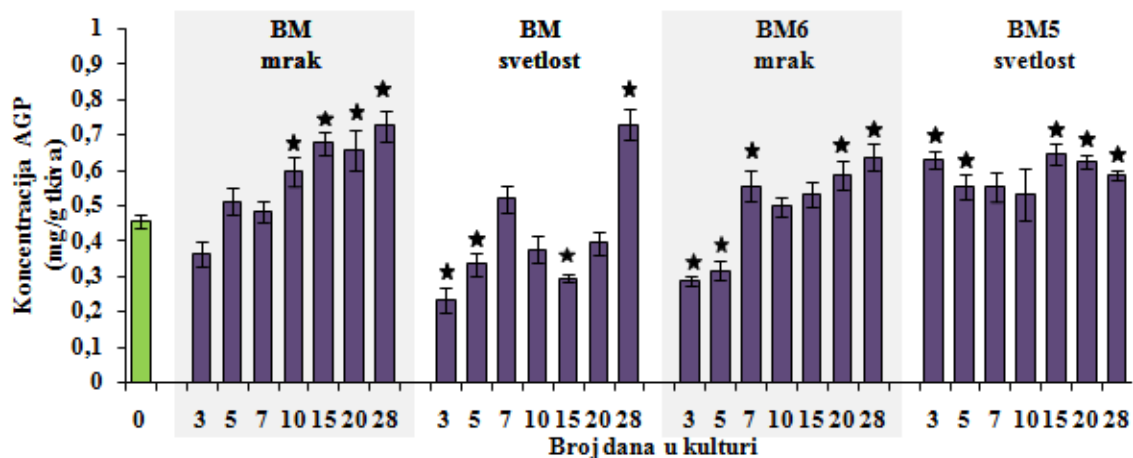
**Slika 27.** Efekat  $\beta$ GlcY na proces organogeneze iz odsečka listova *C. erythraea* nakon 28 dana; a) formiranje adventivnih pupoljaka na svetlosti, na BM hranljivoj podlozi; b) formiranje adventivnih pupoljaka na svetlosti, na BMY75 hranljivoj podlozi; c) rizogeneza u mraku, na BM hranljivoj podlozi; d) rizogeneza u mraku, na BMY75 hranljivoj podlozi; e) izgled eksplantata gajenog na BM hranljivoj podlozi, u mraku; f) izgled eksplantata gajenog na BMY75 hranljivoj podlozi, u mraku.

#### **4.5.2. Kvantifikacija i lokalizacija AGP tokom procesa morfogeneze *in vitro* kičice**

Dinamika promene u sadržaju AGP praćena je tokom 28 dana gajenja odsećaka listova na BM, BM5 hranljivoj podlozi, na svetlosti, i BM6 hranljivoj podlozi, u mraku, pri čemu su eksplantati sakupljeni i analizirani posle 3, 5, 7, 10, 15, 20 i 28 dana. Arabinogalaktanski proteini su kvantifikovani tokom morfogeneze *in vitro* u eksplantatima gajenim na BM i BM5 hranljivim podlogama u prisustvu rastućih koncentracija  $\beta$ GlcY (0 - 150  $\mu$ M), na svetlosti ili u mraku, nakon 28 dana.

##### **4.5.2.1. Koncentracija AGP tokom morfogeneze *in vitro* kičice**

Količina AGP u odsećcima listova kičice se povećavala tokom morfogeneze *in vitro* (Slika 28). Koncentracija AGP u kontrolnim početnim eksplantatima koji nisu gajeni na hranljivim podlogama je bila 0,453 mg/g tkiva. Kod eksplantata gajenih na BM5 hranljivoj podlozi na svetlosti do statistički značajnog povećanja količine AGP u odnosu na početni eksplantat došlo je 3. dana od postavljanja eksplantata na podlogu i konstantno je bila povišena tokom 28 dana. Međutim, kod eksplantata gajenih na BM hranljivoj podlozi, na svetlosti ili u mraku, kao i od eksplantata gajenih na BM6 hranljivoj podlozi u mraku došlo je do smanjenja koncentracije AGP 3. i 5. dana od početka eksperimenta. Nakon 7 dana koncentracija AGP je povećana u eksplantatima gajenim na svim hranljivim podlogama, a do smanjenja je došlo samo na BM hranljivoj podlozi, kod eksplantata gajenih na svetlosti, i to u periodu od 10. do 20. dana od početka eksperimenta. Najveće koncentracije AGP zabeležene su 28. dana posle početka gajenja eksplantata na BM hranljivoj podlozi, i na svetlosti i u mraku (0,72 mg/g tkiva). Kod eksplantata gajenih na induktivnoj BM6 podlozi u mraku maksimalna koncentracija AGP takođe je zabeležena 28. dana ( $0,635 \pm 0,04$  mg/g tkiva), dok je kod eksplantata gajenih na na svetlosti zabeležena 15. dana od početka eksperimenta ( $0,645 \pm 0,03$  mg/g tkiva).



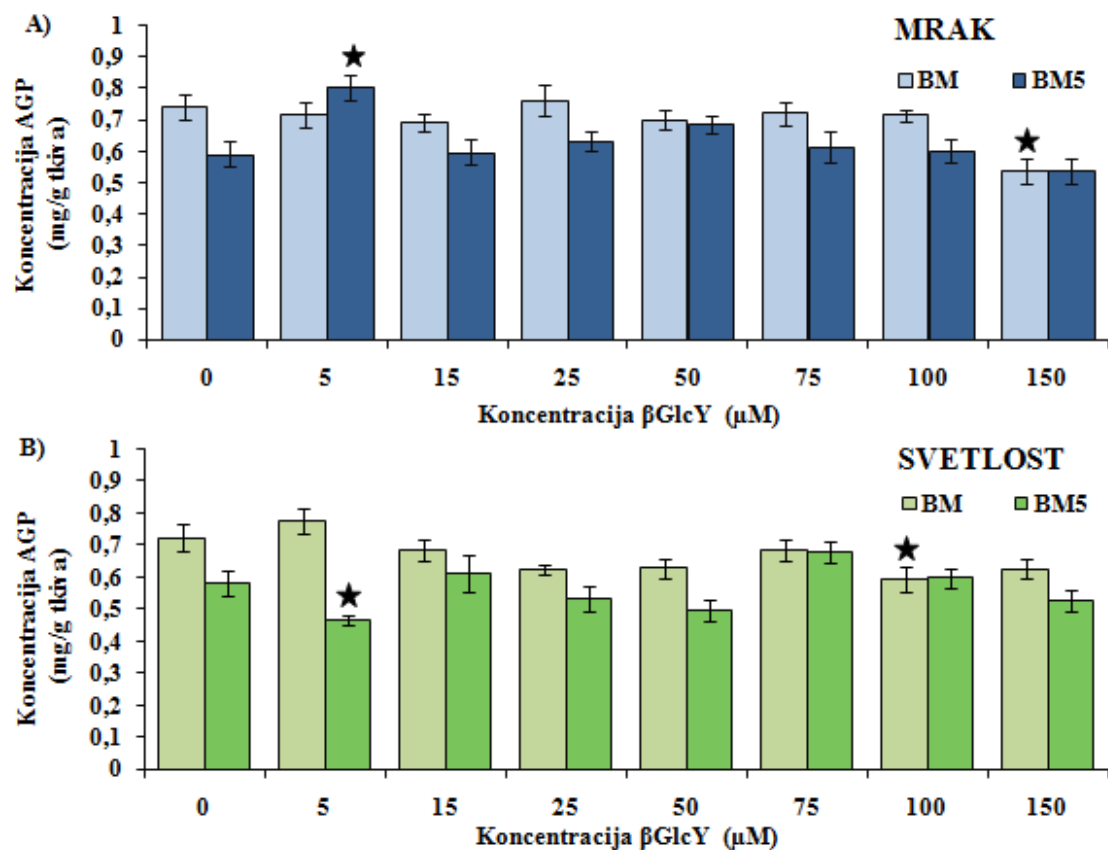
**Slika 28.** Kvantifikacija AGP metodom radijalne difuzije tokom morfogeneze *in vitro*. 0-kontrola (početni eksplantati koji nisu gajeni na hranljivim podlogama). BM, BM5, BM6-oznake hranljivih podloga; Koncentracija AGP je određivana u odsečcima listova gajenim 3, 5, 7, 10, 15, 20 i 28 dana na BM, BM5 ili BM6 hranljivim podlogama. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. Zvezdice predstavljaju oznake statistički značajnih razlika (za  $p \leq 0,05$ ) u odnosu na kontrolu.

#### 4.5.2.2. Koncentracija AGP tokom morfogeneze *in vitro* u prisustvu $\beta$ GlcY

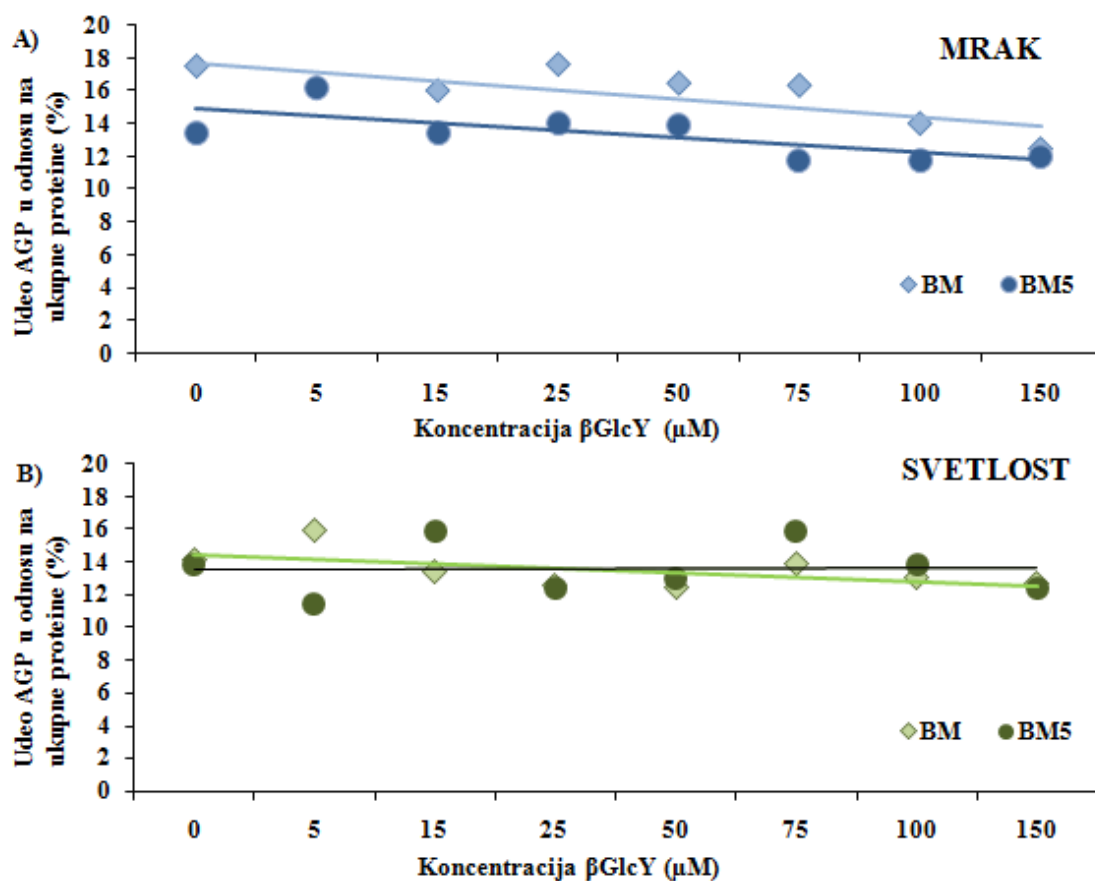
Dodavanje  $\beta$ GlcY u hranljive podloge nije uticalo bitno na količinu AGP u tkivima i statistički značajne promene su uočene samo u pojedinim tretmanima (**Slika 29**). Kao kontrola korišćeni su eksplantati gajeni na BM i BM5 hranljivim podlogama, na svetlosti ili u mraku, tokom 28 dana. Do statistički značajnog povećanja koncentracije AGP došlo je na BM5Y5 hranljivoj podlozi, u mraku, dok je smanjenje uočeno na BMY150 hranljivoj podlozi, u mraku, i BM5Y5 i BMY100 hranljivoj podlozi, na svetlosti.

Kod eksplantata koji su gajeni u mraku sa povećanjem koncentracije  $\beta$ GlcY u hranljivoj podlozi dolazi do blagog pada udela AGP u ukupnim proteinima, a kod eksplantata koji su gajeni na svetlosti ne dolazi do promena udela AGP (**Slika 30**).





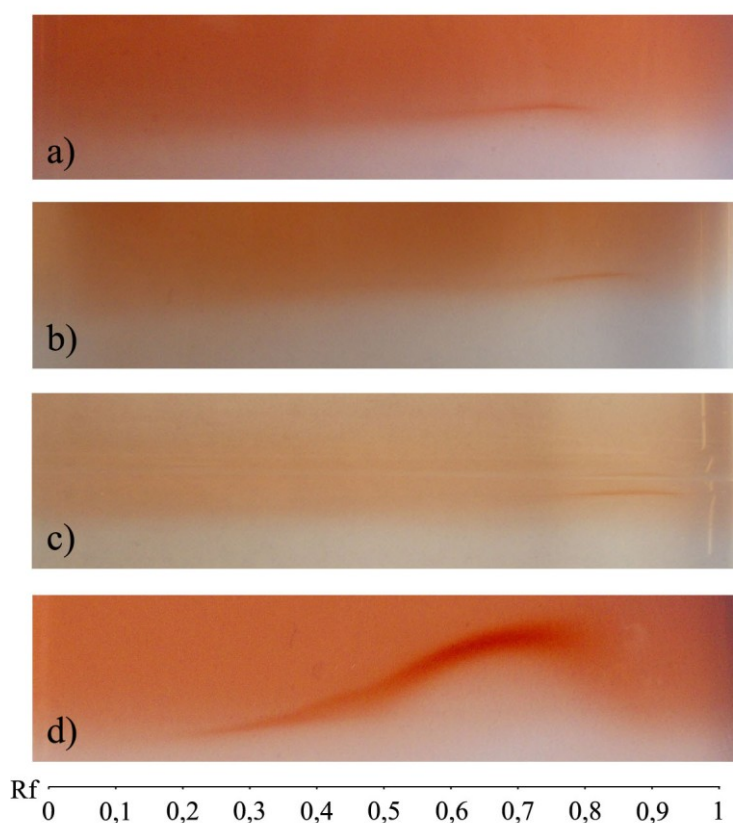
**Slika 29.** Efekat  $\beta$ GlcY na koncentraciju AGP koja je određena metodom radijalne difuzije tokom morfogeneze *in vitro*: A) u mraku; B) na svetlosti. 0 - kontrola (odsecci listova gajeni na BM i BM5 hranljivim podlogama, na svetlosti ili u mraku, tokom 28 dana); BM, BM5 - oznake hranljivih podloga. Koncentracija AGP je određivana u odseccima listova gajenim na BM ili BM5 hranljivim podlogama u koje je dodavan  $\beta$ GlcY u koncentraciji od 5, 15, 25, 50, 75, 100 ili 150  $\mu$ M, na svetlosti ili u mraku. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. Zvezdice predstavljaju oznake statistički značajnih razlika (za  $p \leq 0,05$ ) u odnosu na kontrolu.



**Slika 30.** Udeo AGP u odnosu na ukupne proteine tokom morfogeneze *in vitro* u prisustvu  $\beta$ GlcY: A) u mraku; B) na svetlosti. 0 - kontrola (odsecci listova gajeni na BM i BM5 hranljivim podlogama, na svetlosti ili u mraku, tokom 28 dana); BM, BM5 - oznake hranljivih podloga. Koncentracija AGP je određivana u odseccima listova gajenim na BM ili BM5 hranljivim podlogama u koje je dodavan  $\beta$ GlcY u koncentraciji od 5, 15, 2, 50, 75, 100 ili 150  $\mu$ M, na svetlosti ili u mraku.

### 4.5.2.3. Elektroforetski profil AGP tokom morfogeneze *in vitro* kičice

U cilju razdvajanja i upoređivanja AGP iz odsečaka listova kičice tokom morfogeneze *in vitro*, analiziran je elektroforetski profil AGP ukrštenom elektroforezom. U eksplantatima gajenim na BM5 hranljivoj podlozi 15 dana, na svetlosti, detektovana je jedna klasa AGP koja je difuzno raspoređena u pogledu naelektrisanja, sa slabo izraženim precipitacionim maksimumom čija je Rf vrednost 0,750 (**Slika 31a**). AGP izolovani iz eksplantata gajenih u mraku na BM i BM5Y5 hranljivim podlogama odlikuju se nešto većom elektroforetskom mobilnošću, sa precipitacionim maksimumima sa Rf vrednostima od 0,821 i 0,875 (**Slike 31b i c**). Kod gumiarabike, koja predstavlja referentni arabinogalaktanski protein, su detektovane dve klase AGP, odnosno dva precipitaciona maksimuma sa Rf vrednostima od 0,425 i 0,671 (**Slika 31d**).

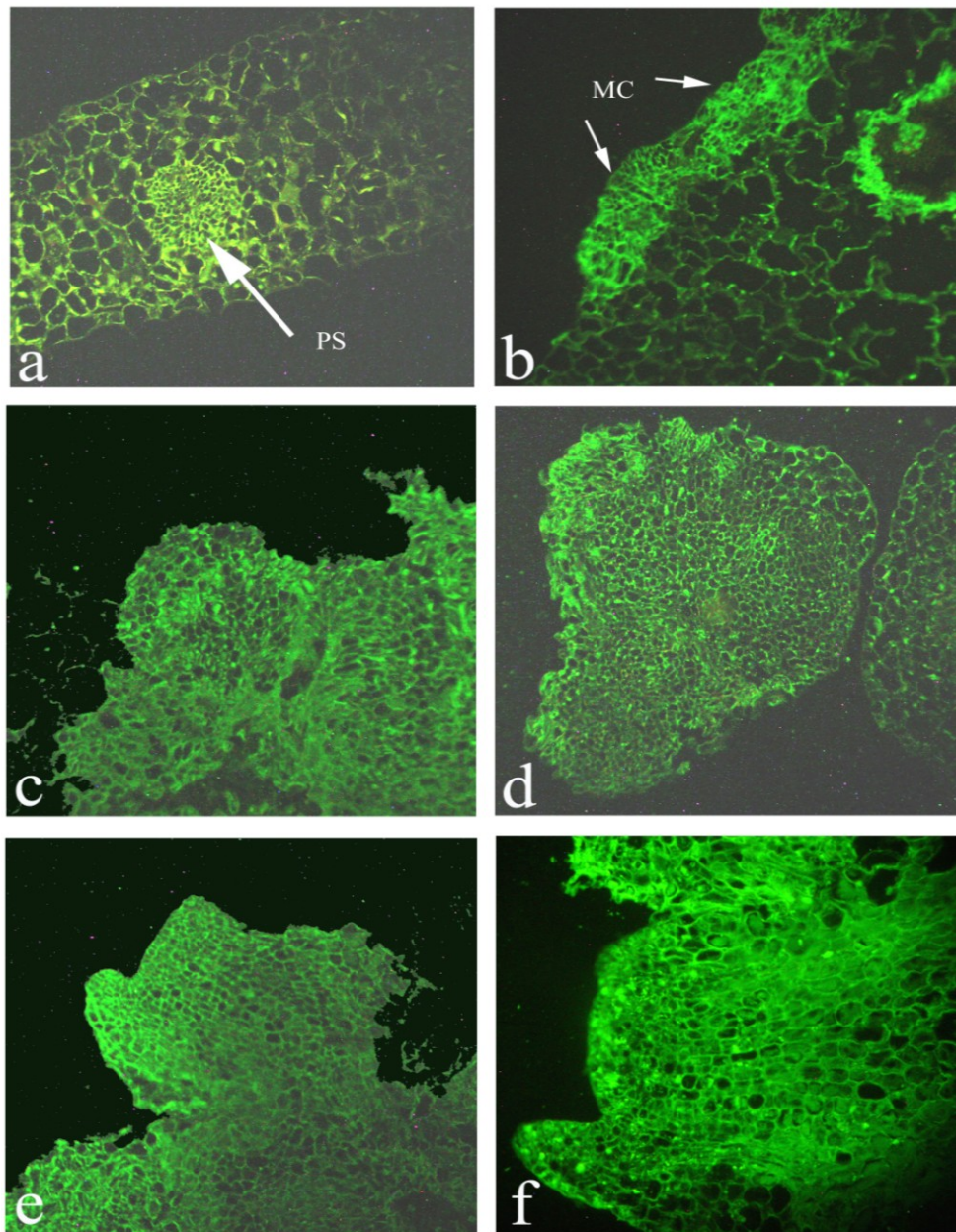


**Slika 31.** Elektroforetski profil AGP kičice dobijen metodom ukrštene elektroforeze. AGP su izolovani iz odsečaka listova gajenih na: a) na BM5 hranljivoj podlozi tokom 15 dana, na svetlosti; b) na BM hranljivoj podlozi tokom 20 dana, u mraku; c) na BM5Y5 hranljivoj podlozi tokom 28 dana, u mraku; d) elektroforetski profil gumiarabike, koja predstavlja referentni arabinogalaktanski protein. Rf – retencioni faktori.



#### **4.5.2.4. Imunohistochemijska lokalizacija AGP tokom morfogeneze *in vitro* kičice**

U cilju ispitivanja prisustva pojedinih epitopa AGP (LM2, JIM4 i JIM13) urađena je njihova imunohistochemijska lokalizacija tokom procesa morfogeneze *in vitro* iz odsečaka listova kičice. Arabinogalaktanski proteini koji imaju specifičan epitop za koji se vezuje LM2 monoklono antitelo, a za njega i sekundarno antitelo povezano sa fluorescentnom fluoroforom FITC uočavaju se u skoro svim ćelijama listova gajenih 7 dana na BM hranljivoj podlozi (**Slika 32a**). Reakcija ovog epitopa je izraženija u ćelijama provodnih snopića. AGP sa LM2 epitopom su prisutni u proembriogenim centrima subepidermalnog sloja eksplantata koji su gajeni na induktivnim hranljivim podlogama. Jasno se uočava granica između embriogenog tkiva i okolnog tkiva mezofila lista (**Slika 32b**). Izraženo prisustvo ovog tipa epitopa uočava se i na ranim stadijumima razvića somatskih embriona kičice (**Slika 32c i d**). AGP bogati JIM4 epitopom uočavaju se u ćelijama somatskih embriona na ranom kotiledonarnom stadijumu razvića (**Slika 32e**). Na anatomskim presecima kompletno diferenciranih somatskih embriona može se uočiti prisustvo AGP koji sadrže JIM13 epitop (**Slika 32f**).



**Slika 32.** Indirektna imunohistohemijska lokalizacija AGP tokom procesa morfogeneze *in vitro* kičice. Imunohistohemijska lokalizacija AGP u: a) odsečku lista pomoću LM2 antitela, reakcija je posebno izražena u ćelijama provodnih snopića (PS); b) meristemskim ćelijama (MC) subepidermalnog sloja lista pomoću LM2 antitela; c) proembriogenim strukturama pomoću LM2 antitela; d) globularnom somatskom embrionu pomoću LM2 antitela; e) somatskom embrionu na ranom kotiledonarnom stadijumu razvića pomoću JIM4 antitela; f) somatskom embrionu na kotiledonarnom stadijumu razvića pomoću JIM13 antitela.

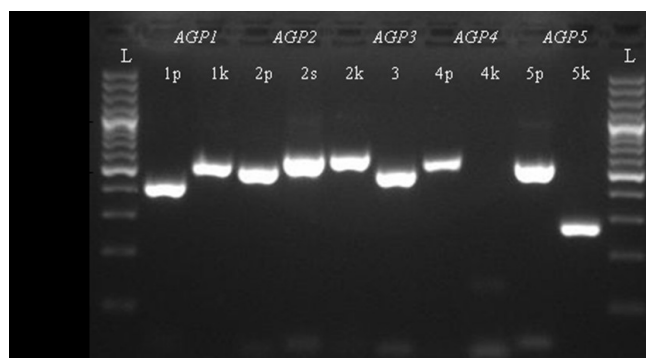
### 4.5.3. Sekvenciranje *AGP* gena i karakterizacija proteinskih sekvenci AGP kičice

Sintezu AGP kodira veliki broj gena, u skladu sa njihovim brojnim funkcijama i različitom strukturom. U *NCBI* bazi nukleotidnih sekvenci, *GenBank*, pronađen je veliki broj sekvenci različitih biljnih vrsta koje kodiraju sintezu AGP, od kojih su neke iskorišćene kao upitne sekvence za pretraživanje baze sekvenci korena i lista kičice. Od 86 sekvenci koje su korišćene kao upitne sekvence, uočeno je da su 9 AGP sekvenci drugih biljnih vrsta (**Tabela 14**) pokazivale sličnost sa sekvencama kičice. Pretraživanjem sekvenciranog i rekonstruisanog transkriptoma korena i lista pomoću ovih AGP sekvenci pronađeno je pet grupa sličnih sekvenci kičice koje su predstavljale 5 potencijalnih gena koji kodiraju sintezu AGP kičice, označenih kao *CeAGP1*, *CeAGP2*, *CeAGP3*, *CeAGP4* i *CeAGP5*. Za dalju analizu je iz svake grupe sekvenci odabrana najduža sekvenca kao reprezentativna.

**Tabela 14.** AGP sekvence drugih biljnih vrsta koje su pokazivale sličnost sa sekvencama kičice

Vrsta	GenBank™ pristupni br.	Identifikovane sekvence kičice
<i>G. hirsutum</i>	DR176757	<i>CeAGP1</i>
	EF672642.1	<i>CeAGP2</i>
	EF672640.1	
<i>A. thaliana</i>	NM_116029.2	<i>CeAGP3</i>
	NM_124704.2	
<i>V. vinifera</i>	XM_002270390.2	<i>CeAGP4</i>
<i>Z. mays</i>	NM_001154084.1	<i>CeAGP5</i>
	NM_001155433.1	
	EU961273.1	

Ispravnost ovih sekvenci je proverena direktnim sekvenciranjem. Najpre je ispitana ispravnost prajmera dizajniranih za amplifikaciju regiona koji bi se mogli sekvencirati. Svi prajmeri su bili efikasni, osim prajmera za amplifikaciju kraja *CeAGP4* gena (**Slika 33**).



**Slika 33.** PCR produkti *AGP* gena kičice; 1p i 1k- početak i kraj *CeAGP1* gena; 2p, 2s i 2k- početak, sredina i kraj *CeAGP2* gena; 3- *CeAGP3* gen; 4p i 4k-početak i kraj *CeAGP4* gena; 5p i 5k-početak i kraj *CeAGP5* gena; L- DNK marker.

Sekvence koje su potvrđene direktnim sekvenciranjem su anotirane i deponovane u GenBank. Kodirajuće sekvence *CeAGP2*, *CeAGP3* i *CeAGP5* transkripata su kompletne i sastoje se iz 1386 bp, 195bp, odnosno 609 bp. Nasuprot tome, kodirajuće sekvence *CeAGP1* i *CeAGP4* transkripata su delimične jer nedostaje početak sekvence *CeAGP1* i kraj *CeAGP4* (**Tabela 15**).

**Tabela 15.** AGP transkripti kičice

Transkript	GenBan pristupni br.	bp	Kodirajuća sekvenca (CDS)	
			region	bp
<i>CeAGP1</i>	KC733882	707	<1..675, delimična	>675
<i>CeAGP2</i>	KC733883	1580	74..1459, kompletna	1386
<i>CeAGP3</i>	KC733884	439	181..375, kompletna	195
<i>CeAGP4</i>	KC733885	984	1..>984, delimična	>984
<i>CeAGP5</i>	KC733886	663	38..646, kompletna	609

Na osnovu dobijenih nukleotidnih sekvenci gena određena je primarna struktura AGP kičice, a njihovi ID (jedinstveni identifikator proteinske sekvence) su prikazani u **Tabeli 16**.

**Tabela 16.** Karakterizacija AGP kičice; potencijalna mesta N-glikozilacije su podvučena; \*- postojanje N-signalnog peptida ili GPI signala može se pretpostaviti na osnovu poređenja sa AGP drugih biljaka; • - postojanje  $\omega$  i AG-II glikomodula kod CeAGP4 se može predvideti na osnovu poređenja sa drugim proteinima;  $\diamond$ - usled postojanja nepoznatih aminokiselina u sekvenci CeAGP1, CeAGP2 i CeAGP4, nije moguće precizno izračunati MW; pozicije aminokiselina u sekvenci preproteina koje predstavljaju početak motiva ili raspon konzervisanog domena predstavljene su brojevima u subskriptu.

Pre-protein	ID	AGN92421	AGN92422	AGN92423	AGN92424	AGN92425
	AK	>224	461	64	>328	202
	CS	4↓5*	20↓21*	26↓27	19↓20	/
	$\omega$	S <sub>200</sub> *	/	S <sub>39</sub>	•	/
Zreo protein	<b>AG-II Glikomoduli</b> AP/PA/SP/PS TP/PT/VP/PV	2/6/4/3 0/1/1/0	7/4/1/1 0/02/4	2/2/1/0 0/0/0/0	5/0/0/1 0/0/0/0 +•	/
	<b>Mesta N-glikozilacije</b>	<u>NIT</u> <sub>17</sub> , <u>NNS</u> <sub>49</sub> <u>NVT</u> <sub>121</sub> <u>NVS</u> <sub>130</sub>	<u>NIT</u> <sub>75</sub> <u>NLT</u> <sub>289</sub>	/	<u>NIT</u> <sub>21</sub> <u>NIT</u> <sub>122</sub> <u>NIS</u> <sub>156</sub> <u>NIT</u> <sub>183</sub>	NIS <sub>89</sub>
	<b>Domen bogat Lys</b>	KSKKK 179-183	/	/	/	/
	<b>Konzer-visani domeni</b>	Fasciklin 26-161	Fasciklin 49-185 Fasciclin 278-413	DUF1070 32-64	Fasciklin 191-322	PH-GRAM_WBP2 36-137
	<b>AK</b>	196*	441	13	>309	202
	<b>MW, Da</b>	>20433,3 $\diamond$	48350,31 $\diamond$	>1217,21	>32402,95	23041,08 $\diamond$
	<b>Klasa AGP</b>	FLA	FLA	AG peptid	FLA	Ne predstavlja AGP

Dobijene aminokiselinske sekvence AGP kičice su upoređene sa AGP sekvencama drugih biljnih vrsta (**Slike 34, 35, 36, 37 i 38**). Kao rezultat poređenja više proteinskih sekvenci dobijeni su regioni homologije, koji su pokazali da postoje identični aminokiselinski nizovi koji se nalaze na istim pozicijama u AGP različitih biljnih vrsta. CeAGP1, CeAGP2 i CeAGP4 imaju fasciklin domen, što ih svrstava u grupu AGP nalik fasciklinu (**Tabela 16; Slike 34, 35, 37 i 39**). Sekvenca CeAGP2 je kompletna i čini je 461 aminokiselina, dok delimične sekvence CeAGP1 i CeAGP4 čini više od 224, odnosno 328 aminokiselina. CeAGP1 i CeAGP4 proteini poseduju jedan fasciklin domen, dok CeAGP2 poseduju dva fasciklin domena. U okviru fasciklin

domena su identifikovane konzervisane sekvence H1 i H2 kod svih poređenih FLA, kao i adhezivni motiv (**Slike 34, 35 i 37**). H1 konzervisana sekvenca ispitivanih FLA kičice ima strukturu Thr-(Val/Ile)-(Phe/Leu)-Ala-Pro-(Thr/Arg/Asn)-(Asp/Asn)-(Ser/Glu)-Ala-(Phe/Leu/Met). Između H1 i H2 regiona nalazi se adhezivni motiv koga čini motiv Tyr-His koji se nalazi između hidrofobnih aminokiselina (Leu/Val/Ile)-(Leu/Val/Ile), osim kod CeAGP1 gde je prisutan motiv Phe-His. Na osnovu poređenja sa FLA drugih biljaka takođe se uočava konzervisana H2 sekvenca, koja je kod kičice okarakterisana sledećom strukturom: (Val/Ile)-(Tyr/His/Gln/Phe)-(Gln/Gly/Thr)-(Val/Ile)-(Glu/Asp)-(Lys/Arg/Gly/Ser)-(Val/Leu/Ile)-(Leu/Ile/Phe)-(Leu/Ile/Phe)-Pro.

FLA predstavljaju grupu himernih AGP, koji osim fasciklin domena sadrže i AGP domen. U cilju potvrđivanja da se zaista radi o AGP, dalje analize proteinskih sekvenci podrazumevale su ispitivanje strukturnih odlika karakterističnih za AGP, a to je prisustvo AGP domena koji je bogat aminokiselinama Pro, Ala, Ser i Thr u formi dipeptida Ala-Pro, Pro-Ala, Ser-Pro, Pro-Ser, Thr-Pro, Pro-Thr, Val-Pro i Pro-Val, koji predstavljaju AG-II glikomodule i potencijalna mesta hidrosilacije Pro. Ukupan broj nekontinualnih ostataka Pro u formi dipeptida je manuelno pretraživan u svim pretpostavljenim proteinskim sekvencama kičice i prikazan u **Tabeli 16**.

Proteinske sekvence AGP kičice su dalje analizirane pomoću različitih bioinformatičkih programa radi predikcije prisustva N-signalnog peptida, GPI signalne sekvence na C-terminusu i potencijalnih mesta N-glikozilacije. SignalP 4.0 programom određeno je prisustvo N-terminalnog signalnog peptida kod CeAGP4 i mesto odsecanja signalnog peptida (CS) između 19. i 20. aminokiselinskog ostatka, ali ne i kod CeAGP1 i CeAGP2, kod kojih se postojanje ove sekvence može pretpostaviti na osnovu poređenja sa AGP iz različitih biljaka, sa kojima pokazuju visok stepen homologije (**Tabela 16; Slike 34, 35 i 37**). Takođe se postojanje GPI signalne sekvence i mesto dodavanja GPI sidra ( $\omega$ ) kod CeAGP1 i CeAGP4 može pretpostaviti samo na osnovu poređenja sa AGP drugih biljaka, kod kojih smo pomoću programa big-PI Plant Predictor predvideli postojanje ove sekvence (**Slike 37 i 40**). Na osnovu poređenja sa FLA drugih biljaka kod CeAGP4 se može pretpostaviti postojanje AGP domena i GPI signala na C-terminusu, s obzirom da nedostaje kraj sekvence CeAGP4 (**Tabela 16, Slika 40**). Postojanje GPI signala u sekvenci proteina ukazuje na njihovu moguću subćelijsku lokalizaciju, jer su pomoću GPI sidra pričvršćeni za spoljašnju stranu

ćelijske membrane. Prisustvo ovog signala nije predviđeno kod CeAGP2, pa se najverovatnije radi o ekstracelularnom proteinu koji nije pričvršćen za membranu, već se nalazi u ECM.

Kod CeAGP1 je prisutan kratak domen bogat Lys, u okviru AGP domena, kao i kod AGP2 *G. hirsutum* (ABR68797.1) (Liu i sar., 2008) (**Tabela 16; Slika 34**). Za FLA je karakteristično da osim O-glikozilacije koja se odvija u okviru AGP domena, dolazi i do N-glikozilacije. Predviđanje pozicija na kojima dolazi do N-glikozilacije omogućeno je primenom programa NetNGlyc 1.0 Server, koji osim prepoznavanja sekvence N-X-S/T (X≠P), takođe omogućava predikciju asparaginskih ostataka koji će biti glikozilovani u okviru ovih sekvenci (**Tabela 16; Slike 34, 35, 37 i 39**). Predviđeno je postojanje 3 mesta N-glikozilacije u okviru CeAGP1 sekvence, odnosno 2 i 4 mesta u okviru CeAGP2 i CeAGP4 sekvenci.

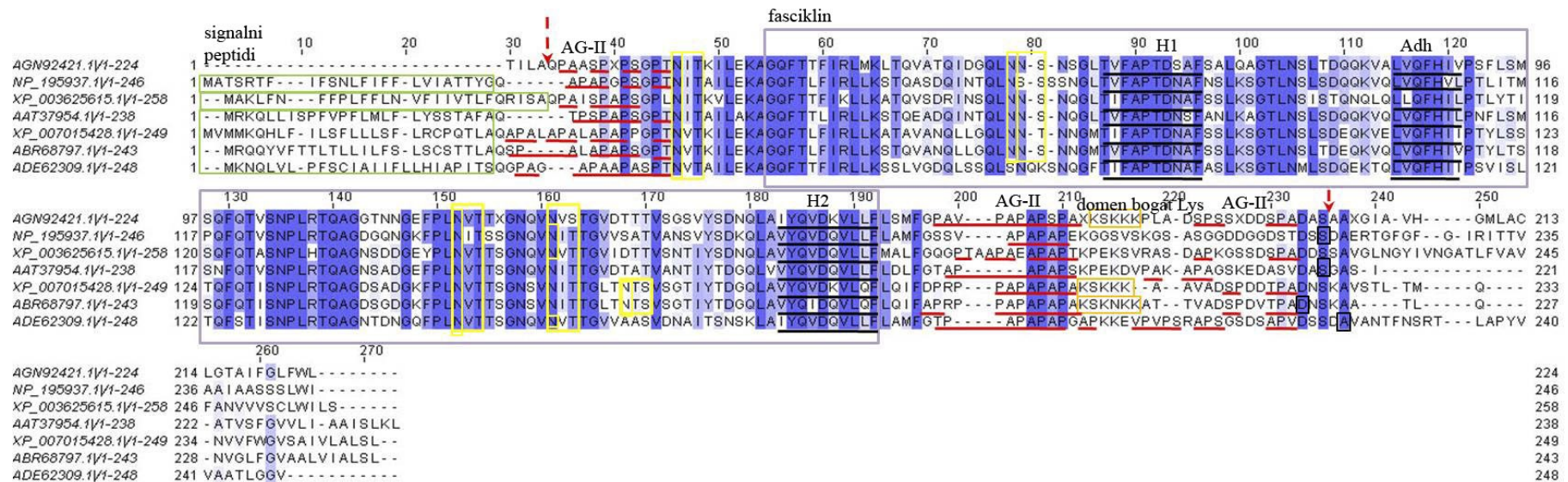
Dužina CeAGP3 iznosi 64 aminokiseline i predviđeno je prisustvo signalne sekvence na N-terminusu i GPI signalne sekvence na C-terminusu pomoću pomenutih algoritama (**Tabela 16; Slika 36**). Predviđena mesta odsecanja N-signalnog peptida i GPI signalne sekvence su između 26. i 27. aminokiselinskog ostatka, odnosno između 39. i 40. aminokiselinskog ostatka, tako da dužina zrelog proteina iznosi svega 13 aminokiselina. Dužina lanca zrelog proteina i prisustvo AG-II modula u vidu tri nekontinualna ostatka Pro koja potencijalno predstavljaju motiv za O-glikozilaciju (SPAPAP), ukazuju na to da CeAGP3 predstavlja AG peptid. Karakteristično za ovaj AG peptid, ali i za mnoge druge AG peptide i AGP različitih vrsta biljaka sa kojima CeAGP3 pokazuje visok stepen homologije je visoko konzervisana sekvenca DUF1070, koja obuhvata deo AGP domena i GPI signalnu sekvencu (**Slika 36**). DUF1070 predstavlja domen sa nepoznatom funkcijom a nalazi se uglavnom kod AGP sa kraćim proteinskim lancima, AG peptida i hipotetičkih proteina biljaka. CeAGP3 ima visok stepen homologije sa AG peptidima iz *V. vinifera*, *A. thaliana*, *Fragaria vesca*, *Prunus mume*, *Medicago truncatula* i drugih biljaka (**Slika 36**).

CeAGP5 ima odličnu homologiju sa mnogim proteinima iz GenBank, ali su samo nekoliko proteina označeni kao AGP, kao na primer AGP *Z. mays*, *Gunnera manicata* i *M. truncatula* (**Slika 38**). Većina su hipotetički proteini sa nepoznatim funkcijama, za koje je karakterističan PH-GRAM\_WBP2 domen, koji predstavlja kompleksan domen koga čini PH-GRAM domen na N-kraju i WWbp domen na C-

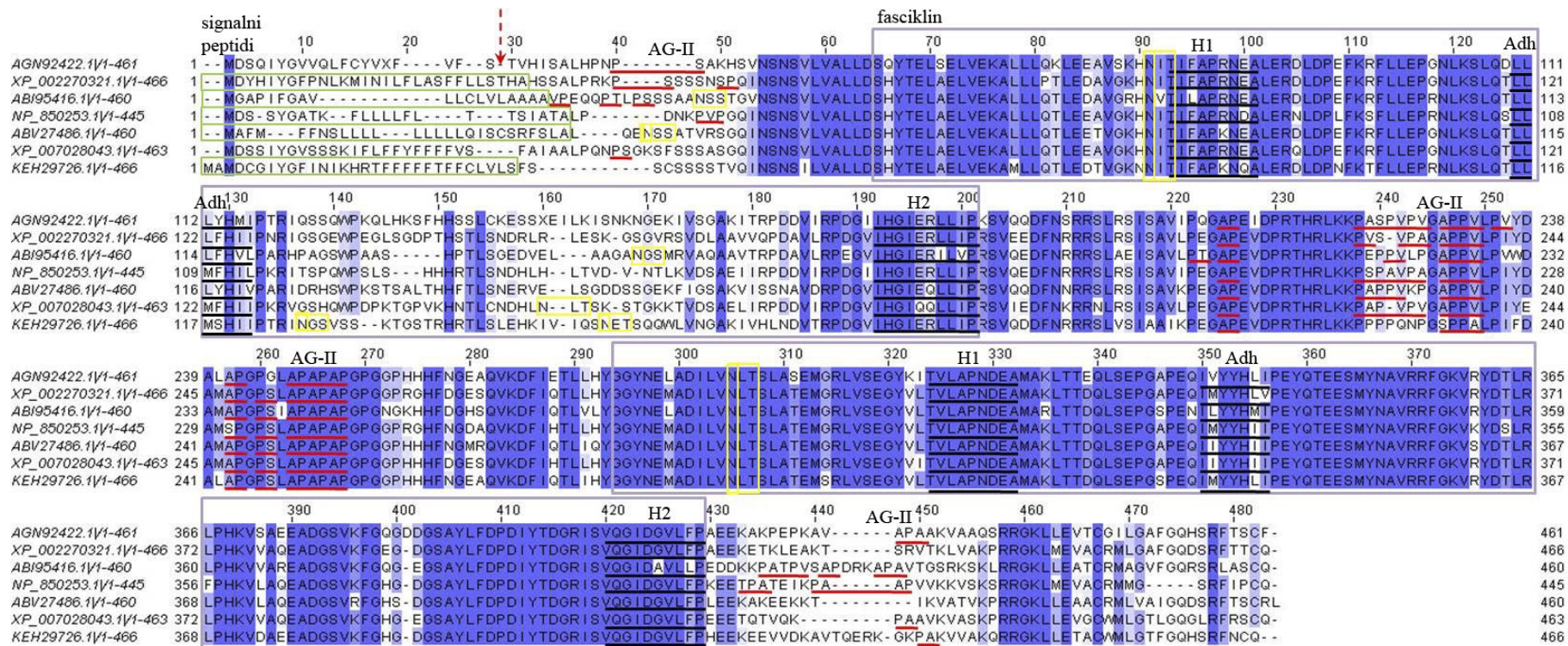
kraju. Za razliku od ostalih ispitivanih sekvenci, kod CeAGP5 nisu uočene strukturne odlike karakteristične za AGP, odnosno postojanje AGP domena, nije predviđeno postojanje N-signalne sekvence, kao ni GPI signala, kao i kod ostalih proteina sa kojima je poređena sekvenca CeAGP5 (**Tabela 16; Slike 38 i 39**). Odsustvo signalnog peptida ukazuje na to da se radi o intracelularnom proteinu.

Molekulske težine pojedinih AGP kičice, usled prisustva pozicija aminokiselina koje su nesigurne, nije moguće precizno predstaviti (**Tabela 16**).





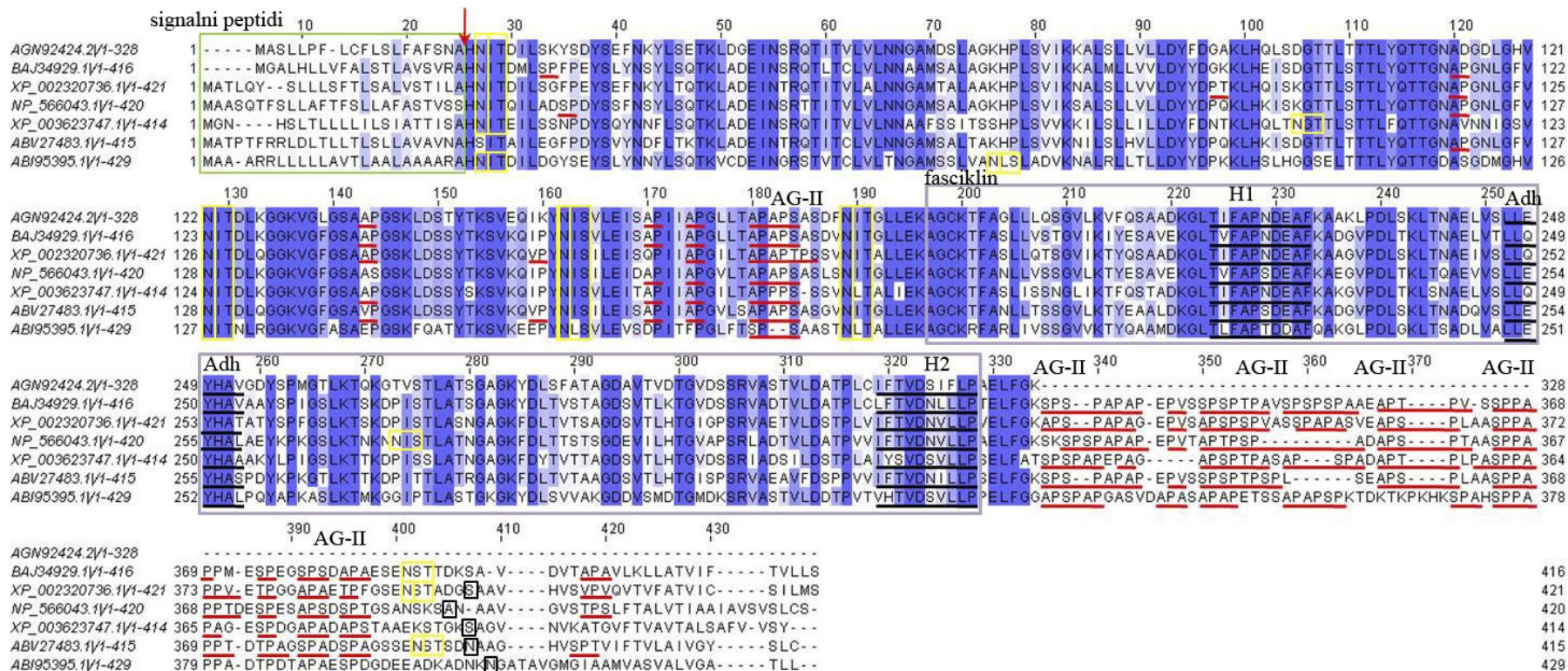
**Slika 34.** Poređenje aminokiselinske sekvence CeAGP1 proteina kičice (AGN92421) sa AGP drugih biljnih vrsta: FLA11 *A. thaliana* (NP\_195937); FLA *Medicago truncatula* (XP\_003625615.1); FLA 11 *P. tremula x P. alba* (AAT37954.1); FLA11 *Theobroma cacao* (XP\_007015428); AGP2 *G. hirsutum* (ABR68797.1); FLA3 *E. nitens* (ADE62309.1); aminokiseline koje su iste kod svih poređenih sekvenci su označene tamno plavom bojom; postepeno svetlijim nijansama plave boje je označen trend smanjenja nivoa homologije; aminokiseline koje su različite kod svih poređenih sekvenci su označene belom bojom; broj na kraju svakog niza predstavlja broj aminokiselina; isprekidanim crvenim strelicama označena su potencijalna mesta odsecanja signalnog peptida na N-terminusu i GPI signala na C-terminusu, koja su pretpostavljena na osnovu poređenja; zelenom bojom je označen signalni peptid; crnom bojom su označene pozicije ω (aminokiseline iza kojih dolazi do odsecanja GPI signalne sekvence); crvenom bojom su označeni AG-II glikomoduli; narandžastom bojom su označeni domeni bogati Lys; žutom bojom su označene pozicije N-glikozilacije, asparaginski ostaci koji će najverovatnije biti glikozilovani u okviru ovih sekvenci su dodatno označeni žutom bojom; ljubičastom bojom je označen fasciklin domen kod koga se uočavaju konzervisane sekvence H1, adhezivni motiv (Adh) i H2.



**Slika 35.** Poređenje aminokiselinske sekvence CeAGP2 proteina kičice (AGN92422) sa AGP drugih biljnih vrsta: predviđeni FLA17 *V. vinifera* (XP\_002270321.1); FLA26 *T. aestivum* (ABI95416.1); FLA16 *A. thaliana* (NP\_850253.1); FLA15 *G. hirsutum* (ABV27486.1); FLA 17 prekursor *T. cacao* (XP\_007028043.1); FLA 16 prekursor *M. truncatula* (KEH29726.1); aminokiseline koje su iste kod svih pet poređenih sekvenci su označene tamno plavom bojom; postepeno svetlijim nijansama plave boje je označen trend smanjenja nivoa homologije; aminokiseline koje su različite kod svih pet poređenih sekvenci su označene belom bojom; broj na kraju svakog niza predstavlja broj aminokiselina; isprekidanom crvenom strelicom označeno je potencijalno mesto odsecanja signalnog peptida na N-terminusu, koje je pretpostavljeno na osnovu poređenja; zelenom bojom je označen signalni peptid; crvenom bojom su označeni AG-II glikomoduli; žutom bojom su označene pozicije N-glikozilacije, asparaginski ostaci koji će najverovatnije biti glikozilovani u okviru ovih sekvenci su dodatno označeni žutom bojom; ljubičastom bojom su označeni fasciklin domeni kod kojih se uočavaju konzervisane sekvence H1, adhezivni motiv (Adh) i H2.

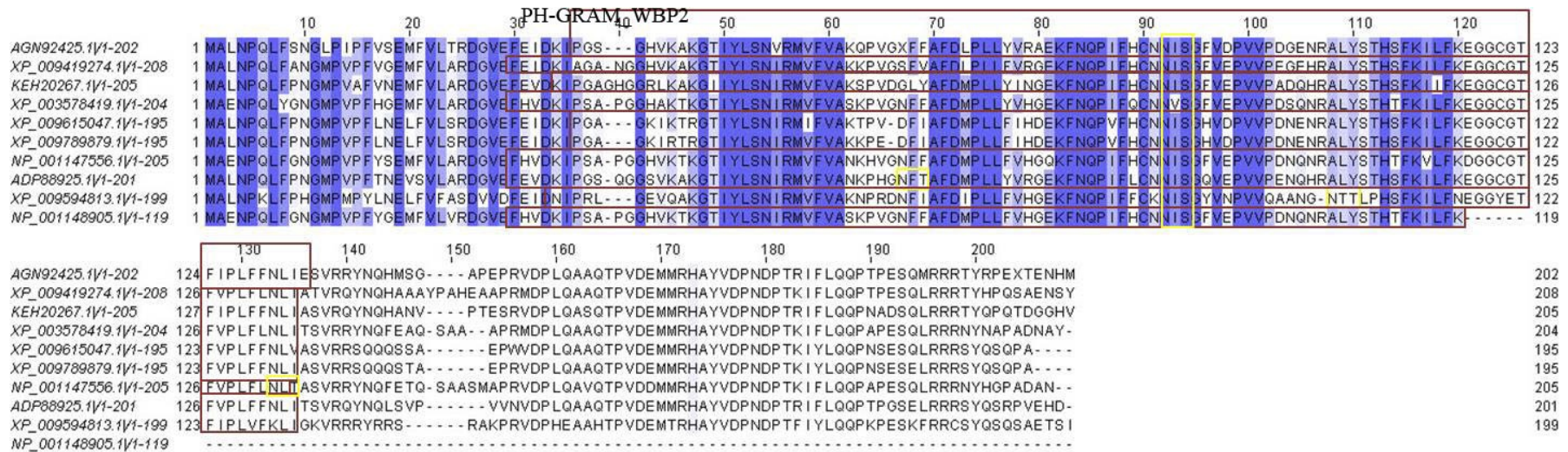




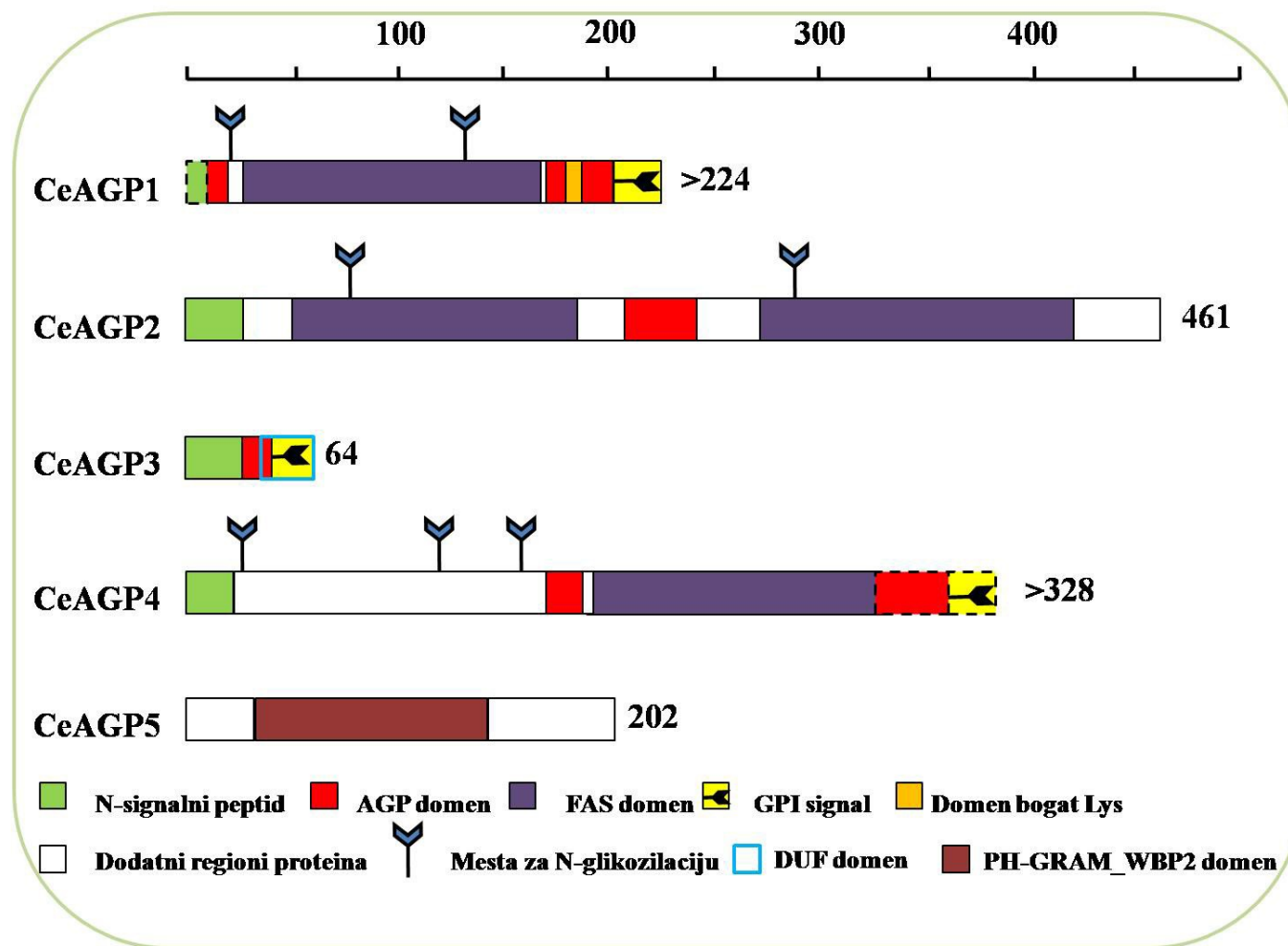


**Slika 37.** Poređenje aminokiselinske sekvence CeAGP4 proteina kičice (AGN92424) sa AGP drugih biljnih vrsta: FLA hibridni kultivar *Vitis sp.* (BAJ34929.1); FLA8 prekursor *P. trichocarpa* (XP\_002320736.1); FLA8 *A. thaliana* (NP\_566043.1); FLA *M. truncatula* (XP\_003623747.1); FLA12 *G. hirsutum* (ABV27483.1); FLA5 *T.aestivum* (ABI95395.1); aminokiseline koje su iste kod svih pet poređenih sekvenci su označene tamno plavom bojom; postepeno svetlijim nijansama plave boje je označen trend smanjenja nivoa homologije; aminokiseline koje su različite kod svih pet poređenih sekvenci su označene belom bojom; broj na kraju svakog niza predstavlja broj aminokiselina; crvenim strelicama označena su potencijalna mesta odsecanja signalnog peptida na N-terminusu; zelenom bojom je označen signalni peptid; crnom bojom su označene pozicije ω (aminokiseline iza kojih dolazi do odsecanja GPI signalne sekvence); crvenom bojom su označeni AG-II glikomoduli; žutom bojom su označene pozicije N-glikozilacije, asparaginski ostaci koji će najverovatnije biti glikozilovani u okviru ovih sekvenci su dodatno označeni žutom bojom; ljubičastom bojom je označen fasciklin domen kod koga se uočavaju konzervisane sekvence H1, adhezivni motiv (Adh) i H2.





**Slika 38.** Poređenje aminokiselinske sekvence CeAGP5 proteina kičice (AGN92425) sa proteinima drugih biljnih vrsta, od kojih su samo neki anotirani kao AGP (AGP *Z. mays* (NP\_001147556.1 i NP\_001148905.1); klasični AGP *G. manicata* (ADP88925.1); AGP *M. truncatula* (KEH20267.1)). dok najveći broj predstavlja hipotetičke proteine: predviđeni UPF0664 stresom indukovani proteini C29B12.11c *Musa accuminata subsp. malaccensis* (XP\_009419274.1), *Brachypodium distachyon* (XP\_003578419.1); *Nicotiana tomentiformis* (XP\_009594813.1) i predviđeni proteini sa WW-vezujućim domenom: *N. tomentiformis* (XP\_009615047.1) i *N. silvestris* (XP\_009789879.1); aminokiseline koje su iste kod svih pet poređenih sekvenci su označene tamno plavom bojom; postepeno svetlijim nijansama plave boje je označen trend smanjenja nivoa homologije; aminokiseline koje su različite kod svih pet poređenih sekvenci su označene belom bojom; broj na kraju svakog niza predstavlja broj aminokiselina; crvenom bojom je označen domen PH-GRAM\_WBP2; žutom bojom su označene pozicije N-glikozilacije, ali je malo verovatno da će doći do N-glikozilacije jer odsustvuje N-signalni peptid.



Slika 39. Shematski prikaz primarne strukture AGP preproteina kičice; isprekidanim linijama su predstavljene nekompletne sekvence (početak CeAGP1 i kraj CeAGP4).

U cilju utvrđivanja aminokiselinskog sastava AGP domena AGP kičice u **Tabeli 17** su prikazani sastav i zastupljenost aminokiselina u primarnoj strukturi CeAGP1, CeAGP2, CeAGP3, CeAGP4 i CeAGP5 preproteina i zrelih proteina, odnosno nakon posttranslacionih modifikacija (uklanjanja signalnog peptida i GPI-signalne sekvence) i bez fasciklin domena. Na ovaj način smo pokazali da su upravo aminokiseline Pro, Ala, Ser i Thr, karakteristične za AGP domen, najzastupljenije u strukturi zrelih proteina, bez fasciklin domena, CeAGP1, CeAGP2, CeAGP3 i CeAGP4.

**Tabela 17.** Sastav aminokiselina (AK) AGP kičice. Sastav AK u primarnoj strukturi preproteina (delimične ili kompletne sekvence) i zrelih proteina kičice CeAGP1, CeAGP2, CeAGP3 i CeAGP4 nakon posttranslacionih modifikacija (uklanjanja N - signalne sekvence i C - hidrofobnog domena (-N-C) i bez FAS domena (-FAS) i kompletne sekvence CeAGP5; X - nepoznate aminokiseline;

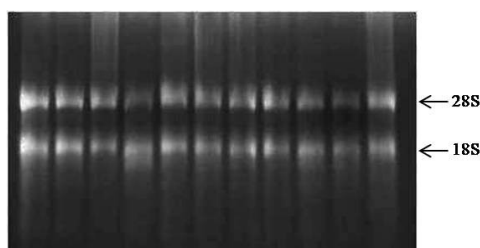
Protein AK	CeAGP1		CeAGP2		CeAGP3		CeAGP4		CeAGP5
	preprotein (delimična)	1-N-C-FAS	preprotein (kompletna)	2-N-2FAS	preprotein (kompletna)	3-N-C	preprotein (delimična)	4-N-FAS	kompletna
Ala	24	10	37	22	14	4	33	13	10
Cys	1	0	4	2	0	0	3	0	2
Asp	10	4	22	5	2	0	22	12	9
Glu	2	1	32	7	1	0	10	7	12
Phe	11	1	17	6	4	1	15	4	17
Gly	16	2	31	12	3	0	27	16	12
His	2	0	17	9	1	0	5	4	6
Ile	9	2	27	6	4	0	15	12	10
Lys	9	6	27	10	0	0	23	14	7
Leu	22	3	48	14	9	0	48	26	14
Met	4	1	5	0	2	0	3	1	8
Asn	12	1	14	5	1	1	12	9	11
Pro	17	12	36	21	4	3	12	6	19
Gln	15	1	19	6	1	0	7	4	9
Arg	2	0	21	8	1	0	2	1	13
Ser	23	10	38	14	5	3	32	17	10
Thr	21	2	16	5	3	1	30	16	9
Val	16	1	32	14	7	0	19	8	16
Trp	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Tyr	2	0	15	2	2	0	10	7	6
X	5	3	2	0	0	0	0	0	2
<b>ukupan broj AK</b>	224	60	461	168	64	13	328	177	202

Na osnovu poređenja sa FLA drugih biljaka, struktura AGP kičice je šematski prikazana na **Slici 39**. Možemo pretpostaviti da CeAGP1 ima 2 AGP domena i jedan FAS domen, kao i kratak domen bogat Lys. CeAGP2 ima 1 AGP domen i 2 FAS domena, dok CeAGP4 ima 2 AGP i 1 FAS domen. Očigledno je da ovi proteini predstavljaju FLA kičice. CeAGP3 ima DUF1070 domen, koji obuhvata deo AGP domena i GPI-signalne sekvence i predstavlja AG peptid. Predviđeno je da svi navedeni AGP kičice poseduju N-signalni peptid i GPI-signalnu sekvencu, osim CeAGP2 koji nema GPI sekvencu. CeAGP5 ne deli strukturne karakteristike AGP, pa najverovatnije ne spada u AGP.

#### **4.5.4. Kvantifikacija ekspresije *AGP* gena tokom morfogeneze *in vitro* kičice**

Nakon identifikacije 4 *AGP* gena kičice, praćena je njihova ekspresija tokom morfogeneze *in vitro* kičice radi utvrđivanja njihove uloge u morfogenetskim procesima. Takođe je praćena ekspresija *CeAGP5* gena tokom ovih procesa, kao neka vrsta kontrole ekspresije gena koji ne predstavlja *AGP* gen.

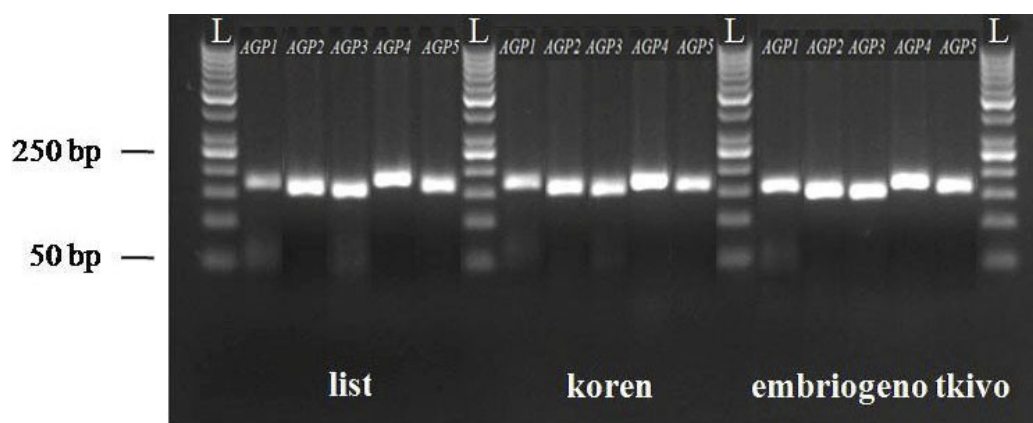
Za određivanje nivoa ekspresije *CeAGP1-CeAGP5* gena korišćen je kvantitativni RT-PCR. Nivo ekspresije ispitivan je u odsečcima listova kičice tokom morfogeneze *in vitro*. Kao kontrola korišćeni su početni odsecci listova, koji nisu gajeni na hranljivim podlogama. Iz lisnih odsečaka, kao i iz intaktnih listova i korenova kičice izolovana je RNK. Proverom kvaliteta izolovanih RNK na agaroznom gelu utvrđeno je da su bile zadovoljavajućeg kvaliteta (**Slika 40**).



**Slika 40.** RNK izolovane iz odsečaka listova kičice tokom morfogeneze *in vitro*.

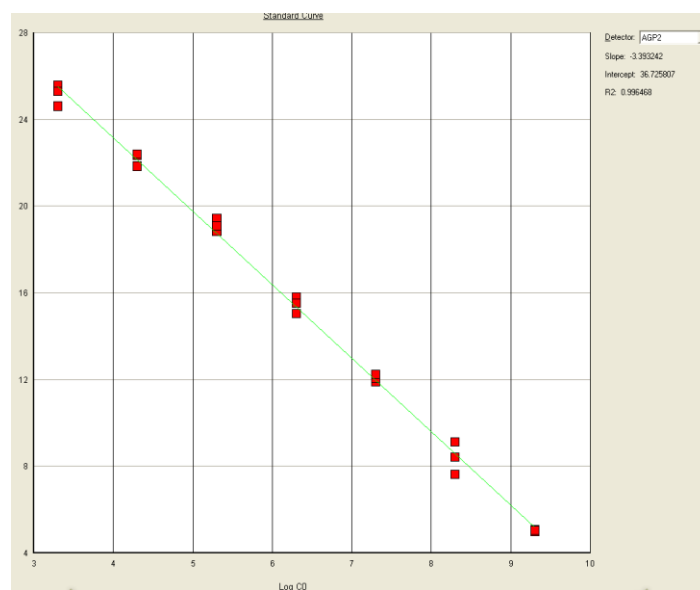


Radi kvantifikacije ekspresije *CeAGP* gena, RNK su prevedene u cDNK reverznom transkripcijom. Dobijene jednolančane cDNK lista, korena i embriogenog tkiva korištene su za proveru ispravnosti prajmera *CeAGP* gena. Specifičnost prajmera potvrđena je gel elektroforezom RT-PCR produkata (**Slika 41**), tako da su korišćeni u daljem radu tokom analize nivoa ekspresije *CeAGP1-CeAGP5* gena.



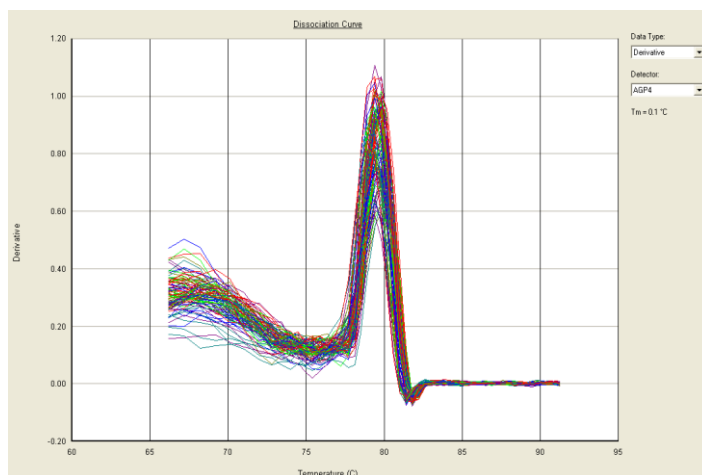
**Slika 41.** PCR produkti *AGP* gena kičice. L-DNK marker.

Dobijeni ampliconi (**Slika 41**) su ekstrahovani iz gela, napravljena je serija razblaženja, koja su potom korišćena kao standardi za apsolutnu kvantifikaciju *CeAGP* transkripata qPCR-om. Primer standardne krive za *CeAGP2* gen prikazan je na **Slici 42**.



**Slika 42.** Primer standardne krive poznate koncentracije amplifikovanih PCR produkata *CeAGP2* gena.

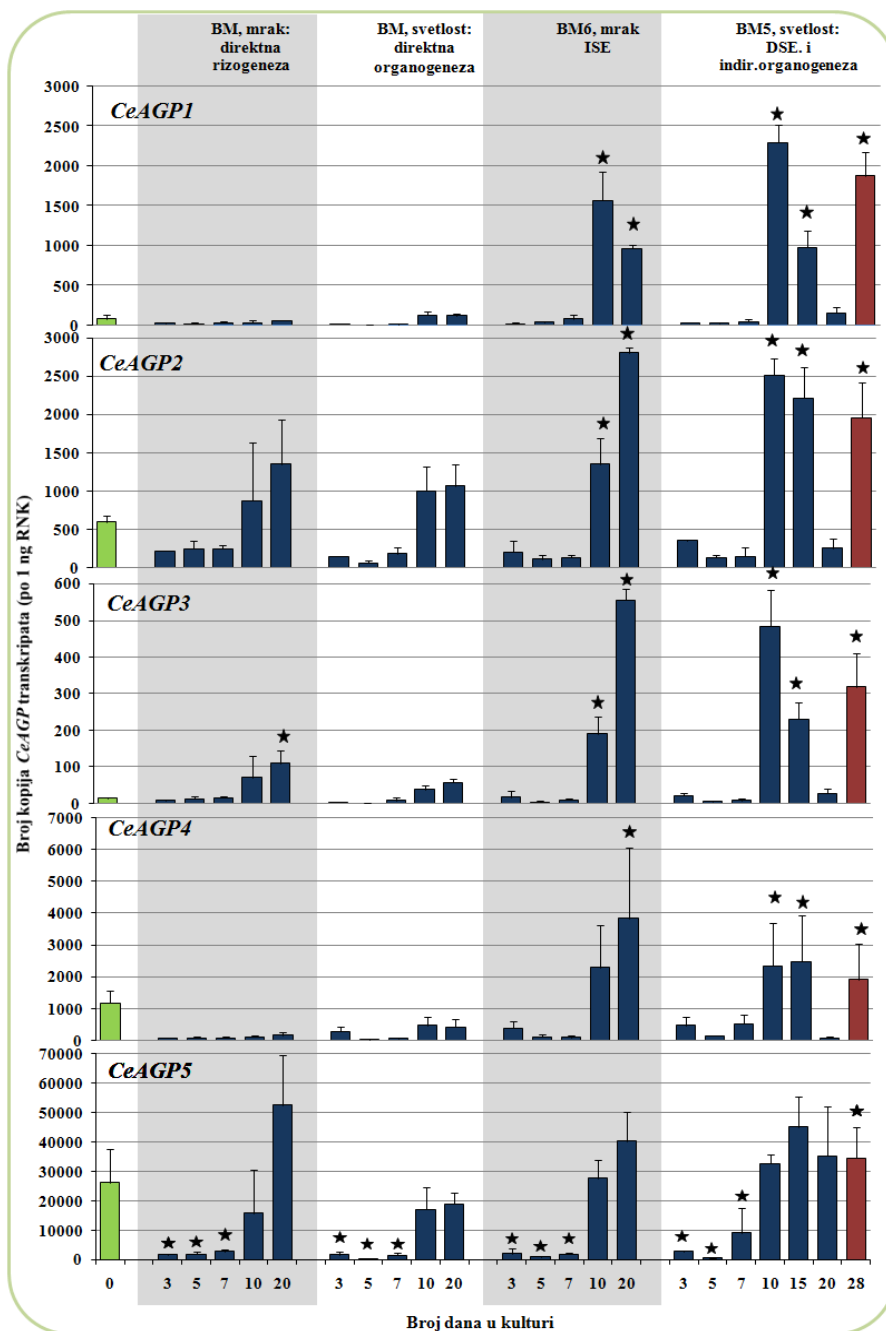
Specifičnost korišćenih prajmera u qPCR reakcijama je potvrđena i analizom krive topljenja za svaki *CeAGP* gen (**Slika 43**). Krive topljenja svih analiziranih uzoraka su bile dobro oblikovane, sa po jednim maksimumom što je označavalo da nije bilo nespecifične amplifikacije.



**Slika 43.** Kriva topljenja amplifikovanih PCR produkata *CeAGP4* gena.

QRT-PCR analizom pratili smo promene u nivou broja kopija transkripata *CeAGP* gena tokom morfogeneze *in vitro*. Dobijeni obrasci ekspresije ispitivanih *CeAGP* gena su se znatno razlikovali, kao i ekspresija ovih gena u kontrolnim eksplantatima (**Slika 44**).

Ekspresija ispitivanih *CeAGP* gena u kontrolnim eksplantatima, koji nisu gajeni na hranljivim podlogama, je bila najmanja u slučaju *CeAGP3* gena, a najveća u slučaju *CeAGP5* gena. Izmerene vrednosti broja kopija transkripata ovih gena, počev od najmanje do najveće su iznosile *CeAGP3* (15 kopija/ng RNK) < *CeAGP1* (86 kopija/ng RNK) < *CeAGP2* (598 kopija/ng RNK) < *CeAGP4* (1175 kopija/ng RNK) < *CeAGP5* (26150 kopija/ng RNK) (**Slika 44**).



**Slika 44.** Broj kopija *CeAGP* transkripata po 1 ng RNK u odsečcima listova tokom morfogeneze. 0 – kontrola (početni odsečki listova koji nisu gajeni na hranljivim podlogama); 28 – odsečki listova gajeni na BM5Y75 hranljivoj podlozi, na svetlosti, tokom 28 dana; BM, BM5, BM6-oznake hranljivih podloga. Stubićima zelene boje su označene vrednosti broja kopija *CeAGP* transkripata po 1 ng RNK u početnim eksplantatima koji su služili kao kontrola; stubićima crvene boje su označene vrednosti broja kopija *CeAGP* transkripata po 1 ng RNK kod eksplantata gajenih na BM5Y75 hranljivoj podlozi, na svetlosti, tokom 28 dana; stubićima plave boje su označene vrednosti broja kopija *CeAGP* transkripata po 1 ng RNK kod eksplantata gajenih na BM hranljivoj podlozi, na svetlosti ili u mraku, na BM5 hranljivoj podlozi, na svetlosti i na BM6 hranljivoj podlozi, u mraku, u različitim vremenskim intervalima od početka eksperimenta, tj. nakon 3, 5, 7, 10, 15, 20 i 28 dana. Vertikalnim linijama predstavljene su standardne greške srednjih vrednosti. Vrednosti označene zvezdicama pokazuju statistički značajne razlike (za  $p \leq 0,05$ ) u poređenju sa kontrolom.

Tokom procesa morfogeneze došlo je do povećanja ekspresije skoro svih ispitivanih gena, ali se u **Tabeli 18** može videti da je povećanje ekspresije najizraženije kod *CeAGP1* i *CeAGP3* gena, a najmanje kod *CeAGP5*. Tokom prvih sedam dana gajenja odsečaka listova na BM, BM5 ili BM6 hranljivim podlogama, na svetlosti ili u mraku, došlo je do statistički značajnog smanjenja broja kopija transkripata *CeAGP5* gena, dok se ekspresija ostalih ispitivanih gena zadržavala na nivou kontrolnih vrednosti kod pojedinih uzoraka ili je bila smanjena, ali smanjenje nije bilo statistički značajno (**Slika 44**). Do povećanja ekspresije došlo je oko desetog dana od početka eksperimenta. Smanjenje broja kopija transkripata *CeAGP1*, *CeAGP2*, *CeAGP3* i *CeAGP4* gena je zapaženo dvadesetog dana samo kod eksplantata gajenih na BM5 hranljivoj podlozi, na svetlosti.

Ekspresija *CeAGP1* gena je povećana samo na hranljivim podlogama sa regulatorima rastenja (BM5 i BM6) na svetlosti i u mraku, dok na BM nije došlo do povećanja ekspresije tokom morfogeneze (**Slika 44**). Kada se broj kopija transkripata svakog *CeAGP* gena izrazi relativno u odnosu na kontrolu i predstavi u vidu logaritamskih vrednosti, može se videti da je došlo do značajnog povećanja ekspresije *CeAGP1* gena na BM5 i BM6 hranljivim podlogama desetog dana od početka eksperimenta (**Tabela 18**). Sličan obrazac ekspresije kao *CeAGP1* imao je *CeAGP4* gen. Kod eksplantata gajenih na induktivnim BM5 i BM6 hranljivim podlogama, dobijeno je povećanje ekspresije *CeAGP4* gena, ali s obzirom na ekspresiju ovog gena koja je postojala u kontrolnim eksplantatima vrednosti relativne ekspresije su niske (**Tabela 18**).

Za razliku od *CeAGP1* i *CeAGP4* gena, *CeAGP2* gen je imao drugačiji obrazac ekspresije tokom procesa *in vitro* morfogeneze kod kičice, jer je blago povećanje ekspresije u odnosu na nivo u kontrolnim eksplantatima detektovano i kod eksplantata gajenih na BM hranljivoj podlozi, na svetlosti ili u mraku. Međutim, do statistički značajnog povećanja došlo je samo na hranljivim podlogama sa regulatorima rastenja, BM5 i BM6 (**Tabela 18**).

Ekspresija *CeAGP3* gena je statistički značajno povećana kod eksplantata gajenih na BM hranljivoj podlozi, 20. dana u mraku i kod eksplantata gajenih na podlogama sa regulatorima rastenja, BM5 i BM6, 10. dana i 20. Dana (**Tabela 18**). Tokom morfogenetskih procesa iz odsečaka listova kičice ekspresija *CeAGP5* gena je

blago povećana tek desetog dana od početka gajenja eksplantata na BM, BM5 ili BM6 hranljivim podlogama, na svetlosti ili u mraku.

Ekspresija svih *CeAGP* gena je bila povećana kod odsečaka listova koji su gajeni na BM5Y75 hranljivoj podlozi, na svetlosti (Slika 44). Prisustvo  $\beta$ GlcY u hranljivoj podlozi je dovelo do statistički značajnog povećanja broja kopija transkripata svih *CeAGP* gena (Slika 44).

**Tabela 18.** Relativna ekspresija *CeAGP* gena u odsečcima listova kičice tokom morfogeneze *in vitro*. Apsolutna ekspresija *CeAGP* gena (Slika 44) u odsečcima listova kičice tokom morfogeneze *in vitro* je normalizovana u odnosu na kontrolu (početni odsečki listova koji nisu gajeni na hranljivim podlogama) i predstavljena u vidu  $\log_2$  vrednosti. Y75 – eksplantati gajeni na BM5Y75 hranljivoj podlozi; BM, BM5, BM6 - oznake hranljivih podloga; Crvenom bojom su označene vrednosti relativne ekspresije koje ukazuju na povećanje ekspresije *CeAGP* gena, zelenom bojom su označene vrednosti relativne ekspresije koje ukazuju na redukciju ekspresije *CeAGP* gena.

Tretman	Dani u kulturi	Geni				
		<i>CeAGP1</i>	<i>CeAGP2</i>	<i>CeAGP3</i>	<i>CeAGP4</i>	<i>CeAGP5</i>
BM mrak	3	-1,40	-1,45	-0,85	-3,98	-4,02
	5	-1,81	-1,25	-0,15	-4,04	-3,81
	7	-1,19	-1,24	0,03	-3,82	-3,24
	10	-1,29	0,55	2,25	-3,43	-0,73
	20	-0,35	1,18	2,86	-2,84	1,01
BM svetlost	3	-2,04	-2,00	-1,69	-2,06	-3,90
	5	-3,10	-3,15	-4,08	-5,37	-6,64
	7	-2,35	-1,67	-0,73	-4,29	-4,11
	10	0,60	0,75	1,34	-1,32	-0,61
	20	0,55	0,83	1,91	-1,46	-0,47
BM6 mrak	3	-1,79	-1,53	0,21	-1,62	-3,66
	5	-1,00	-2,37	-1,79	-3,43	-4,85
	7	0,02	-2,13	-0,68	-3,51	-3,84
	10	4,19	1,18	3,65	0,96	0,08
	20	3,49	2,23	5,19	1,70	0,63
BM5 svetlost Y75	3	-1,26	-0,76	0,53	-1,33	-3,27
	5	-1,65	-2,11	-1,50	-2,96	-5,75
	7	-0,78	-1,97	-0,71	-1,17	-1,52
	10	4,74	2,07	5,00	1,00	0,32
	15	3,51	1,89	3,93	1,08	0,79
	20	0,89	-1,23	0,92	-3,76	0,43
	28	4,45	1,71	4,39	0,71	0,40



## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Morfogeneza iz odsečaka listova kičice *in vitro*

Uspeh regeneracije somatskih embriona, pupoljaka i korenova *in vitro* zavisi od različitih faktora, među kojima genotip, izbor eksplantata i egzogeno dodati regulatori rastjenja imaju veliki uticaj (Gaj i sar., 2004; Phillips i sar., 2004). Na osnovu prethodnih istraživanja, može se zaključiti da je kičica biljna vrsta koja se odlikuje visokom regenerativnom sposobnošću i da se među ispitivanim eksplantatima listovi i korenovi kičice odlikuju visokim morfogenetskim potencijalom (**Slika 5**) (Subotić i sar., 2003/4; 2006; 2009a; 2009b; 2009c; Subotić i Grubišić, 2007; Piatzak i Wysokinska, 2003). Iako su odsecci listova korišćeni na samom početku istraživanja morfogenetskih procesa kod kičice, regenerativni potencijal listova kičice je nedovoljno ispitan. U dosadašnjim istraživanjima je istraživana efekat različitih hranljivih podloga (LS i MS) i različitih regulatora rastjenja (BAP, KIN, IAA, NAA, 2,4 D) na indukciju kalusogeneze i organogeneze iz odsečaka listova kičice (Čellarová i sar., 1983; Barešova i sar., 1985; Laureova i sar., 1986; Piatzak i Wysokinska, 2003). Kultura listova, kao tehnika za *in vitro* uzgajanje izolovanih listova, se uglavnom ne koristi, jer se listovi sami kao eksplantati ne mogu održati u kulturi. Međutim, odsecci listova, postavljeni kao eksplantati, imaju veliki značaj jer se iz njih može indukovati pojava kalusa, pupoljaka i somatskih embriona. Kod različitih vrsta biljaka iz odsečaka listova postignuta je uspešna regeneracija putem SE (Fiuk i Rybczynski, 2008 a, b; Cantelmo i sar., 2013), organogeneze (Chaudhuri i sar., 2008; Singh i sar., 2013) ili istovremenom pojavom oba procesa (Ma i Xu, 2002; Yang i sar., 2012). Posebnu prednost odsečaka listova predstavlja činjenica da su listovi sa *in vitro* gajenih biljaka lako dostupan izvor eksplantata, što omogućava primenu ovih eksplantata u umnožavanju ugroženih vrsta i u molekularnim istraživanjima. Odsecci listova iz kojih je indukovana SE predstavljaju pogodan model sisteme za ispitivanje molekularnih aspekata SE (Lucau-Danila i sar., 2010; Imin i sar., 2008).

U našem istraživanju koristili smo odsečke listova kao početne eksplantate za ispitivanje morfogeneze *in vitro* i pokazali da morfogenetski odgovor varira u zavisnosti od primenjenih koncentracija regulatora rastjenja i uslova osvetljenja (**Tabela 13**). Na

BM hranljivoj podlozi, bez regulatora rastenja, javila se spontana regeneracija putem direktne organogeneze pupoljaka na svetlosti i putem direktne rizogeneze u mraku (Slika 9). Spontana regeneracija pupoljaka putem direktne organogeneze iz odsečaka listova kičice, opisana je u literaturi. Piatzak i Wysokinska (2003) su uočili direktno formiranje adventivnih pupoljaka ali sa malom frekvencom (manje od deset pupoljaka po eksplantatu) iz odsečaka listova kičice na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja. Direktna organogeneza i DSE su opisane u kulturi korenova kičice na  $1/2$ MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja (Subotić i Grubišić, 2007; Subotić i sar., 2009b; Trifunović i sar., 2014).

U istraživanjima koja su prethodila ovom radu ispitani su efekti različitih regulatora rastenja, 2,4-D u kombinaciji sa različitim citokininima BAP, KIN, TDZ i CPPU, na proces morfogeneze iz odsečaka listova kičice u mraku. Ustanovljeno je da je samo CPPU indukovao formiranje somatskih embriona, dok je u prisustvu ostalih citokinina indukovana proliferacija ćelija kalusa. Podaci iz literature ukazuju na efikasnost ovog regulatora rastenja u indukciji različitih morfogenetskih procesa. Pomoću CPPU indukovana je SE iz eksplantata dekorativne vrste *Epipremnum aureum* Bunt. (Zhang i sar., 2005). Kod pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides*), CPPU je doveo do formiranja somatskih embriona iz odsečaka listova, za razliku od BAP i TDZ koji su indukovali nastanak adventivnih pupoljaka (Sriskandarajah i Lundquist, 2009). Pokazano je da su sintetički derivati feniluree, CPPU i TDZ, bili efikasniji u indukciji adventivnih pupoljaka u kulturi korenova i kulturi transformisanih korenova kičice u odnosu na derivate adenina, KIN i BAP (Subotić i sar., 2009b). Takođe je CPPU bio efikasniji u odnosu na BAP u indukciji pupoljaka iz eksplantata stabla vrste *Tasmania stipitata* (Sriskandarajah i Goodwin, 2005) i kulturi transformisanih korenova *Kalanchoe blossfeldiana* (Christensen i sar., 2008). Primenom 2,4-D u kulturi *in vitro* mogu biti indukovani različiti morfogenetski odgovori, kao što su formiranje somatskih embriona, pupoljaka i korenova, koji se mogu uočiti na istom eksplantatu, kao na primer kod odsečaka listova dunje (*Cydonia oblonga*) (Morini i sar., 2000). 2,4-D je do sada slabo korišćen u kulturi kičice, uglavnom za rast kalusa i ćelijskih suspenzija (Čellárová i sar, 1983; Laureova i sar, 1986; Meravy, 1987), ali je takođe u prisustvu ovog regulatora rastenja došlo do formiranja pupoljaka i somatskih embriona u kulturi korenova kičice (Subotić i sar., 2006). Kod nekoliko vrsta roda *Gentiana*, gde su

indukcija embriogenog kalusa i formiranje somatskih embriona iz odsečaka listova postignuti kombinacijom različitih auksina i citokinina, 2,4-D je bio manje efikasan u odnosu na druge primenjene auksine, NAA i dikambu (Fiuk i Rybczynski, 2008a; 2008b). Kod nekih vrsta orhideja 2,4-D predstavlja negativan faktor u indukciji DSE iz odsečaka listova (Chen i sar., 2001; Chung i sar., 2007), a takođe inhibira formiranje somatskih embriona kod limuna (*Citrus limon*) i narandže (*C. sinensis*) (Fiore i sar., 2002).

Primenom niskih koncentracija regulatora rastenja, CPPU (0,01-0,5 mg/l) i 2,4-D (0,2 mg/l) dobili smo visoko regenerativan sistem gde su u kratkom vremenskom roku uspešno indukovane ISE i indirektna organogeneza. Na hranljivim podlogama sa regulatorima rastenja došlo je do formiranja kalusa na odsečcima listova kičice, uglavnom po obodu izolovanog eksplantata tokom druge nedelje gajenja i nakon 28 dana procenat eksplantata koji su formirali kalus je bio 100% na induktivnim hranljivim podlogama (**Tabela 13**)

Na BM1 podlozi indukovane su tri vrste kalusa na eksplantatima, rizogeni, embriogeni i organogeni kalus (**Tabela 13**; **Slika 10c, e**). Rizogeni kalus preovladava na eksplantatima gajenim na ovoj podlozi (veći udeo 2,4-D u odnosu na CPPU), što je u skladu sa činjenicom da povećanje odnosa auksin-citokinin pomera proces morfogeneze ka formiranju korenova i kalusa (Skoog i Miller, 1957). Na pojedinim eksplantatima gajenim na svetlosti ili u mraku uočen je embriogeni kalus (**Tabela 13**), dok je organogeni kalus uočen samo na eksplantatima gajenim na svetlosti (**Slika 10c, e**). Na hranljivim podlogama koje su sadržale CPPU u koncentracijama većim od 0,05 mg/l (BM3-BM6) indukovana je SE, i na svetlosti i u mraku (**Slika 12a**). Takođe je sa porastom koncentracije CPPU došlo do porasta broja eksplantata na kojima je formiran embriogeni kalus bez obzira na uslove osvetljenja u kojima su eksplantati gajeni (**Tabela 13**). Primenom kombinacije ova dva regulatora rastenja, 2,4-D i CPPU, indukovano je formiranje embriogenog kalusa i somatskih embriona iz odsečaka listova *Gentiana kuroo* (Fiuk i Rybczynski, 2008a). Suprotno ovim rezultatima, kombinacija 2,4-D i CPPU je inhibirala indukciju SE kod *C. limon* i *C. sinensis* (Fiore i sar., 2002). Somatska embriogeneza kičice prvi put je indukovana u suspenziji ćelija koja vodi poreklo od kalusa formiranog na odsečcima listova, korišćenjem IAA i KIN na LS hranljivoj podlozi (Barešova i Kaminek, 1984), dok je na čvrstoj MS hranljivoj podlozi



bez regulatora rastinja u kulturi korenova kičice DSE bila spontana (Subotić i sar., 2006). Sa povećanjem koncentracije CPPU dodavanog u podloge, povećavao se procenat eksplantata na kojima su formirani adventivni pupoljci na svetlosti (**Tabela 13**). Poznato je da visok odnos citokinin-auksin promoviše formiranje pupoljaka iz kalusa. Slične rezultate dobili su Subotić i saradnici (2009b), gde se sa povećanjem koncentracije CPPU (0,01 - 3,0  $\mu$ M) povećavao broj adventivnih pupoljaka formiranih u procesu direktne organogeneze u kulturi korenova kičice ( $0,61 \pm 0,07$  -  $25,61 \pm 0,53$ ).

Za razliku od SE, proces organogeneze pupoljaka iz odsečaka listova kičice se odvijao samo na svetlosti (**Tabela 13**; **Slike 9a**; **10b, d, f**; **13**). U našem eksperimentalnom sistemu smo na ovaj način, gajenjem eksplantata na svetlosti, postigli razdvajanje ova dva morfogenetska procesa, što je značajno za uspostavljanje pogodnog model-sistema za proučavanje molekularnih aspekata SE. Postoje podaci da kod nekih vrsta ne dolazi do organogeneze izdanaka kada se kulture gaje u mraku, npr. kod odsečaka listova petunije (*Petunia hybrida* R27) (Reuveni i Evenor, 2007) i odsečaka hipokotila *Albizia odoratissima* (Rajeswari i Paliwal, 2008) gajenih u mraku. Bertram i Lercari (2000) su demonstrirali da sticanje kompetencije za formiranje pupoljaka iz odsečaka hipokotila paradajza (*Solanum lycopersicum*) reguliše svetlost i da je u tu regulaciju uključen fitohrom. Kod nekih vrsta svetlost je stimulisala obrazovanje pupoljaka, bilo direktnom organogenezom iz odsečaka korenova kao kod kičice (Subotić i sar., 2003/4; 2006), bilo indirektnom organogenezom iz odsečaka listova i petiola kao kod jagode (Tian i sar., 2003). Subotić i saradnici (2006) su pokazali da je prosečan broj spontano regenerisanih pupoljaka u kulturi korenova kičice na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastinja, veći na svetlosti ( $3,08 \pm 0,45$ ) nego u mraku ( $0,12 \pm 0,03$ ). U ovom radu je uočeno stimulatívno dejstvo svetlosti tokom procesa SE, jer je u uslovima fotoperioda od 16 h svetlosti i 8 h mraka (dug dan) uočen veći procenat eksplantata na kojima je formiran embriogeni kalus u odnosu na eksplantate gajene u mraku (**Tabela 13**). Takođe je broj somatskih embriona u kulturi korenova kičice uglavnom veći kod kultura korenova gajenih na svetlosti (Subotić i saradnici (2009c). Gajenje odsečaka listova *Petiveria alliacea* na svetlosti je rezultovalo većom frekvencijom embriogeneze i većim brojem embriona po eksplantatu u odnosu na eksplantate gajene u mraku (Cantelmo i sar., 2013). Stimulatívno dejstvo svetlosti na

embriogenezu je pokazano i kod orhideje *Dendrobium* cv. Chiengmai Pink (Chung i sar., 2007).

Anatomskim istraživanjima je potvrđeno da su se na svetlosti istovremeno odvijali procesi SE i organogeneze (**Slika 10f**). Istovremena i asinhrona pojava somatskih embriona i adventivnih pupoljaka na istom eksplantu je već opisana u kulturi korenova kičice ali je regeneracija bila direktna, bez obrazovanja kalusa, i spontana, na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rasteinja (Subotić i sar., 2006; Subotić i Grubišić, 2007). Istovremena pojava SE i organogeneze pupoljaka iz odsečaka listova opisana je i kod drugih vrsta, na primer kod afričke ljubičice (*Saintpaulia ionantha*) (Mithila i sar., 2003), *Ochona integerrima* (Ma i sar., 2011) i *Primulina tabacum* (Yang i sar., 2012). U literaturi nismo našli podatke o poreklu somatskih embriona i adventivnih pupoljaka iz odsečaka listova kičice. Pojava velikih intercelulara u mezofilu se uočava na uzdužnom preseku listova kičice gajenih u uslovima *in vitro* (**Slika 16a**), što je uočeno i kod drugih vrsta familije *Gentianaceae*, na primer *G. kuroo* (Fiuk i Rybczynski, 2008a) i *G. pneumonanthe* (Bach i Pawlowska, 2003). Proces SE je bio asinhron, pa su se nakon 28 dana gajenja na induktivnoj hranljivoj podlozi, na presecima mogli uočiti meristemski centri i somatski embrioni svih razvojnih stadijuma. Ovakva asinhronost procesa SE iz odsečaka listova je opisana kod vrsta roda *Gentiana* (Fiuk i Rybczynski, 2008a, b), kao i kulturi korenova kičice (Subotić i Grubišić, 2007). Somatski embrioni se formiraju putem indirektna SE iz odsečaka listova kičice, a vode poreklo od ćelija subepidermalnog sloja (**Slika 16**). Organogeneza pupoljaka iz odsečaka listova kičice po tipu je indirektna, a pupoljci vode poreklo od ćelija mezofila i subepidermalnog sloja odsečaka listova (**Slika 17**).

Visok morfogetetski potencijal listova kičice, potvrđen u našim istraživanjima, i regeneracija somatskih embriona koji će dati celu biljku, pupoljaka i korenova omogućeni su zahvaljujući sposobnosti pojedinih potpuno diferenciranih ćelija mezofila i subepidermisa lista, da se u različitim induktivnim uslovima dediferencijaciju i zatim dovedu u stanje pluripotentnosti. Ponovnim ulaskom u ćelijski ciklus i aktivacijom ćelijskih deoba ovih ćelija, a zatim i njihovom rediferencijacijom postiže se regeneracija organa. Tokom formiranja somatskih embriona u procesu SE, ćelije koje se dele prate novi program razvića, sličan zigotskoj embriogenezi, a različit od onog koji se dešava

prilikom organogeneze, odnosno regeneracije biljaka putem organogeneze (Feher, 2015; Grafi i Barak, 2014).

## **5.2. Aktivnost antioksidativnih enzima tokom procesa morfogeneze *in vitro* kičice**

Aktivnost antioksidativnih enzima SOD, CAT i POX je analizirana tokom različitih morfofenetskih procesa koji su se dešavali na odsečcima listova kičice gajenim na BM, BM1 i BM6 hranljivim podlogama *in vitro*. Mnoga istraživanja pokazuju da tokom morfogeneze *in vitro* dolazi do promena aktivnosti antioksidativnih enzima, koje mogu da imaju važnu ulogu u morfofenetskim procesima kod različitih biljnih vrsta (Tian i sar., 2003; Libik i sar., 2005). Povišena aktivnost ovih enzima može biti antioksidativni odgovor na oksidativni stres izazvan različitim faktorima u kulturi *in vitro*, do nje dolazi u cilju smanjenja visokih, toksičnih koncentracija ROS i zaštite ćelija, ali se promene aktivnosti ovih enzima mogu dovesti u vezu i sa ulogom ROS u morfofenetskim procesima.

SOD, CAT i POX predstavljaju enzimske komponente antioksidativnog sistema biljaka i ključne faktore u regulisanju nivoa ROS u ćelijama. Superoksid dismutaze predstavljaju prvu liniju odbrane ćelije od reaktivnih vrsta kiseonika (Alcher i sar., 2002). Ovi enzimi katalizuju razgradnju superoksid radikala, pri čemu nastaje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, čije razlaganje obavljaju CAT i različite POX.

U intaktnim listovima kičice, koji su služili kao izvor eksplantata, u listovima regeneranata kao i u odsečcima listova tokom procesa morfogeneze *in vitro*, detektovana je aktivnost tri izoforme Cu/Zn-SOD, koje su označene kao A, B i C (**Slike 18, 19A, 20A**). Pored toga, u eksplantatima koji su gajeni na BM hranljivoj podlozi u trajanju od 14 dana na svetlosti indukovana je pojava jedne Mn-SOD izoforme i jedne katalazne izoforme (CAT A). Na zimogramima katalaza su inače uočene tri katalazne izoforme (CAT B, C i D), a osim njih detektovano je postojanje više izoformi koje nisu razdvojene a odlikuju se većom mobilnošću (**Slike 21A, 22A**).

Za razliku od SOD i CAT, prilikom dokazivanja aktivnosti POX gel testom, koristili smo različite supstrate, jer posle bojenja sa najčešće korišćenim POX supstratima, gvajakolom i pirogalolom, izoforme POX nisu uočene na gelu. Kada smo

za gel esej peroksidaza kao supstrat koristili 4-hloro- $\alpha$ -naftol, na gelovima je uočeno više bliskih traka aktivnosti koje nisu bile razdvojene, osim kod pojedinih uzoraka gde su uočene diskretne trake izoformi (Slike 23A, 24A). Za razliku od odsečaka listova kičice, uzorci drugih biljnih vrsta, na primer Lepog Jove (*Impatiens walleriana*) (Milošević i sar., 2012), koji su pri istim elektroforetskim uslovima služili kao pozitivna kontrola u ovom radu, pokazivali su jasne zimograme prilikom korišćenja svih supstrata. može se zaključiti da su POX kičice najverovatnije inaktivisane tokom elektroforeze iz nepoznatih razloga, možda kao posledica osetljivosti na neke komponente gela, na primer nepolimerizovane ostatke akrilamida i slično. Ukupna aktivnost POX, određena spektrofotometrijskom metodom, gde je korišćen pirogalol kao elektron-donor, je bila značajno povišena tokom procesa morfogeneze iz odsečaka listova kičice. U listovima regeneranata gajenih *in vitro* detektovana je povišena totalna aktivnost CAT i POX u odnosu na aktivnost u inaktivnim listovima biljaka koje su služile kao izvor eksplantata (Slike 21A, 22A, 23A, 24A). U literaturi ima podataka o promenama aktivnosti antioksidativnih enzima u regenerisanim tkivima i biljkama. Meratan i saradnici (2009) su detektovali povišenu aktivnost CAT u regenerisanim izdancima i povišenu aktivnost POX u regenerisanim korenovima *Acanthophyllum sordidum*, koje povezuju sa ulogom ovih enzima u rastenju i diferencijaciji.

Oksidativni stres može biti izazvan različitim faktorima u kulturi *in vitro*, među kojima su i povrede tkiva biljaka do kojih dolazi prilikom izolovanja eksplantata i drugih *in vitro* manipulacija. Yahraus i saradnici (1995) su pokazali da biljne ćelije reaguju na fizičku povredu iniciranjem oksidativnog stresa, u cilju zaštite ćelija u blizini povrede od efekata mehaničkog stresa. Na mestima povrede lista veoma brzo dolazi do generisanja  $H_2O_2$ , jedan sat nakon povrede (Orozco-Cardenas i Ryan, 1999), koji kao učesnik u prenosu signala inicira uključivanje odbrambenih mehanizama, tj. kako enzimskih tako i neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema. Povećana produkcija  $H_2O_2$ , nastala u reakciji na povredu, najverovatnije dovodi do indukcije ekspresije gena koji kodiraju CAT u embrionima i listovima *Z. mays* (Guan i Scandalios, 2000). Slesak i saradnici (2008) su pokazali da mehanička povreda listova *M. cristallinum* takođe dovodi do generisanja  $H_2O_2$  i povišene ukupne aktivnosti SOD, ali i do smanjene aktivnosti CAT. Fizička povreda listova kičice do koje je došlo prilikom izolovanja eksplantata indukovala je aktivnost svih SOD i CAT izoformi i

povećanje ukupne aktivnosti ovih enzima (**Slike 19, 20, 21, 22**). Nasuprot tome, kumulativna i ukupna aktivnost POX je bila smanjena u odnosu na kontrolu (**Slike 23, 24**). Niska aktivnost POX je detektovana i u sveže izolovanim odsečcima listova *Dactylis glomerata* (Somleva i sar., 2000). U sveže izolovanim odsečcima hipokotila *Albizia odoratissima* detektovana je niska ukupna aktivnost POX i povišena CAT aktivnost CAT (Rajeswari i Paliwal, 2008).

Analizom aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT i POX) tokom morfogeneze *in vitro* iz odsečaka listova kičice gajenih na BM, BM1 i BM6 hranljivim podlogama, tokom 28 dana, na svetlosti i u mraku, pokazano je da dolazi do promena aktivnosti i, u manjoj meri, izoenzimskog profila antioksidativnih enzima. Nakon sedam dana gajenja eksplantata na hranljivim podlogama uočavaju se promene u aktivnosti SOD, čija se vrednost smanjuje u odnosu na vrednost u sveže izolovanim eksplantatima ali predstavlja i najvišu izmerenu vrednost tokom gajenja eksplantata u kulturi u trajanju od 28 dana, osim 14. i 21. dana tokom SE na BM6 podlozi (**Slike 19, 20**). Kairong i saradnici (1999) su pretpostavili da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ima ulogu sekundarnog glasnika u procesu SE, i samim tim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> može uticati na ekspresiju gena i na taj način stimulisati formiranje embriogenih ćelija. Tokom indukcije procesa indirektna SE u kalusu *L. barbarum* aktivnost SOD se povećavala sa povećanjem nivoa diferenciranosti ćelija u somatskim embrionima, a maksimalnu vrednost je dostizala sedmog dana, u vreme pojave višćelijskih embriona (Kairong i sar., 1999). Tian i saradnici (2003) su pokazali da tokom indukcije indirektna organogeneze u kalusu jagode dolazi do povećanja aktivnosti SOD i dostizanja maksimalne vrednosti desetog dana, nakon čega aktivnost SOD opada. Porast aktivnosti SOD je praćen nagomilavanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, za koga autori pretpostavljaju da bi mogao imati ulogu u inicijaciji formiranja pupoljaka (Tian i sar., 2003). Povišena aktivnost SOD tokom prve nedelje gajenja eksplantata na hranljivim podlogama, dobijena u ovom radu, može se dovesti u vezu sa oksidativnim stresom izazvanim povredom listova kičice, koji predstavlja okidač za otpočinjanje procesa dediferencijacije i indukcije morfogeneze. Osim toga, prve ćelijske deobe subepidermalnih slojeva lista kičice i formiranje meristemskih centara su uočeni upravo nakon sedam dana (**Slika 16b**). Spontana regeneracija koja se javila na BM podlozi bez regulatora rastanja i regeneranti formirani na obodima izolovanog eksplantata listova kičice (**Slika 11**) ukazuju na efekat mehaničke povrede, do koje dolazi prilikom

izolacije eksplantata, na indukciju morfogogenetskih procesa. Tokom daljeg gajenja eksplantata (28 dana) na BM1 i BM6 hranljivim podlogama na svetlosti detektovano je smanjenje kumulativne aktivnosti Cu/ZnSOD, dok su kod eksplantata gajenih na BM hranljivoj podlozi, kao i u mraku kumulativne vrednosti Cu/ZnSOD uglavnom bile nepromenjene u odnosu na kontrolnu vrednost. Rezultati ukazuju na to da se nisu mogle uočiti razlike u aktivnosti Cu/ZnSOD u zavisnosti od morfogogenetskog procesa, mada se najveće smanjenje aktivnosti Cu/ZnSOD, koje je praćeno izostankom izoformi Cu/ZnSOD A i Cu/ZnSOD C, moglo uočiti kod odsečaka listova gajenih na BM6 podlozi, na svetlosti, na kojima je istovremeno detektovana indirektna organogeneza pupoljaka i SE (**Slika 19**). Aktivnost Cu/ZnSOD je bila slična u nemorfogenom, rizogenom i embriogenom kalusu *M. cristalinum*, dok su aktivnosti Mn-SOD i Fe-SOD značajno varirale u zavisnosti od morfogogenetskog procesa (Libik i sar., 2005). Konieczky i saradnici (2008) su detektovali sličan obrazac aktivnosti Cu/ZnSOD izoformi tokom indukcije organogeneze i SE kod suncokreta (*Helianthus annuus*) ali je nasuprot tome aktivnost Mn-SOD bila izraženija tokom organogeneze. Tokom različitih faza SE kod šafrana (*Crocus sativus*) bile su prisutne sve Cu/ZnSOD i Mn-SOD izoforme, sa povećanjem Mn-SOD i smanjenjem Cu/ZnSOD aktivnosti u somatskim embrionima na kotiledonarnom stadijumu razvića (Blazquez i sar., 2009). Za razliku od navedenih podataka o pojavi Mn-SOD izoforme kako tokom procesa organogeneze, tako i tokom procesa SE, u ovom radu pojava Mn-SOD izoforme detektovana je samo na jednom tretmanu, tokom procesa direktne organogeneze na svetlosti, 14. dana, kod eksplantata gajenih na BM hranljivoj podlozi (**Slika 19A**).

Nakon 7 dana kultivacije *in vitro*, u svim odsečcima listova, bez obzira na hranljivu podlogu i uslove osvetljenja na kojima su gajeni, došlo je do pada aktivnosti CAT na nivo koji je detektovan u kontrolnim eksplantatima ili čak i ispod tih vrednosti. Ovi rezultati su u skladu sa smanjenjem aktivnosti CAT u embriogenom kalusu *L. barbarum* (Kairong i sar, 1999). Ovi autori smatraju da je smanjenje aktivnosti CAT značajno za indukciju SE, jer omogućava nagomilavanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kairong i sar, 1999). Kalus sa niskom CAT aktivnošću i visokom koncentracijom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> odlikuje se regenerativnim potencijalom, što je u skladu sa pretpostavkom da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> može indukovati ekspresiju gena odgovornih za indukciju morfogogenetskih procesa (Libik i sar., 2005). Tokom daljeg odvijanja različitih morfogogenetskih procesa, dinamika

promena aktivnosti CAT je bila različita, sa povećanjem kumulativne aktivnosti kod odsečaka listova sa pojedinih tretmana, a nakon 28 dana došlo je do pada aktivnosti CAT kod odsečaka listova gajenih na svim podlogama, bez obzira na uslove osvetljenja (**Slike 21, 22**). Na BM hranljivoj podlozi, na kojoj dolazi do formiranja adventivnih pupoljaka na svetlosti i korenova u mraku, aktivnost CAT je povećana 14. i 21. dana. Povećanje aktivnosti CAT može biti povezano sa procesima diferencijacije tokom indukcije pupoljaka i korenova (Meratan i sar., 2009). Povećanje aktivnosti CAT detektovano je 21. dana tokom indirektno organogeneze *A. odoratissima* na svetlosti (Rajeswari i Paliwal, 2008). Suprotni rezultati su dobijeni tokom indirektno organogeneze u kalusu jagode, jer je aktivnost CAT opadala (Tian i sar., 2003). Aktivnost CAT je varirala u zavisnosti od morfo-genetskog procesa u istom eksperimentalnom sistemu - tokom direktne organogeneze pupoljaka je bila povećana, a tokom SE smanjena kod *H. annuus* (Konieczny i sar., 2008). Nasuprot tome, aktivnost CAT je bila povećana tokom SE (Ghanti i sar., 2009; Blazquez i sar., 2009). Na BM hranljivoj podlozi na svetlosti uočena je pojava dodatne CAT A izoforme 14. dana od početka eksperimenta (**Slika 21A**). Indukcija specifičnih izoformi, Mn-SOD i CAT A, kao i detekcija diskretnih traka POX izoformi samo na ovom tretmanu, 14. dana gajenja eksplantata na BM hranljivoj podlozi na svetlosti (**Slike 19A, 21A, 23A**), ukazuje na moguću ulogu ovih izoformi u procesu direktne organogeneze pupoljaka.

Pored CAT, u uklanjanju  $H_2O_2$  učestvuju i POX. Do generisanja  $H_2O_2$  i drugih ROS dolazi u različitim delovima ćelije, uključujući ćelijsku membranu i apoplast. Ekstracelularne POX klase III imaju značajnu ulogu u preciznoj regulaciji količine ROS u ćeliji i apoplastu jer pored uklanjanja  $H_2O_2$  imaju ulogu i u formiranju ROS (Liszak i sar., 2003; Passardi i sar., 2004). Tokom rastanja i diferenciranja ćelija, POX klase III koje koriste fenolna jedinjenja kao donore elektrona učestvuju u reakcijama polimerizacije u ćelijskom zidu i obrazovanju veza između ekstenzina i polisaharida koji sadrže fenole. Na taj način doprinose umrežavanju i učvršćivanju unakrsnih veza među proteinima novog ćelijskog zida koji se izgrađuje. Kao supstrat za POX,  $H_2O_2$  ima direktnu ulogu u rekonstrukciji ćelijskog zida, jer je potreban za oksidativno formiranje fenolnih slobodnih radikala, koji postaju vrlo reaktivni i reaguju među sobom formirajući polimere. Na ovaj način POX klase III učestvuju u regulaciji izduživanja ćelije. Osim ove osnovne uloge u eliminaciji  $H_2O_2$ , POX klase III takođe

moгу da katalizuju formiranje  $H_2O_2$  i hidroksil radikala (Passardi i sar., 2004; Cosio i Dunand i sar., 2009). Hidroksil radikali učestvuju u razgradnji polisaharida ćelijskog zida, koja je deo procesa rasteња ćelija (Schopfer i sar., 2001; Liskay i sar., 2003). Regulacijom nivoa ROS u apoplastu, ekstracelularne POX klase III ostvaruju ulogu u regulaciji plastičnosti ćelijskog zida, De Marco i Roubelakis-Angelakis (1996) su pokazali da  $H_2O_2$  u apoplastu neophodan za deobe protoplasta, ali akumuliranje ovog molekula u visokim koncentracijama u citoplazmi dovodi do smanjenja regenerativnog potencijala. U ovom radu je pokazano da je tokom procesa morfogeneze iz odsečaka listova kičice ukupna aktivnost POX snažno indukovana (**Slike 23B, 24B**). Do statistički značajnog porasta ukupne aktivnosti POX u odnosu na kontrolu dolazi već nakon sedam dana, kada su uočene prve deobe ćelija i formiranje meristemskih centara u odsečcima listova kičice. Povišene aktivnosti POX su detektovane tokom različitih morfogenetskih procesa u kulturi *in vitro*. Aktivnost POX je povišena tokom indukcije SE iz odsečaka listova *D. glomerata* (Somleva i sar., 2000) i kod leblebije (*Cicer arietinum*) (Ghanti i sar., 2009). Međutim, tokom formiranja embriogenih ćelija *L. barbarum* aktivnost POX je niska i postepeno raste sa diferenciranjem ćelija. Aktivnosti POX je povišena tokom indirektno organogeneze *A. odoratissima* na svetlosti, za razliku od smanjene aktivnosti POX u neorganogenom kalusu gajenom u mraku (Rajeswari i Paliwal, 2008).

Ispitivanjem aktivnosti SOD, CAT i POX utvrđeno je da tokom morfogenetskih procesa iz odsečaka listova kičice dolazi do promena u enzimskom antioksidativnom sistemu kičice. Naši rezultati ukazuju na to da su SOD i CAT uključene u antioksidativnu zaštitu listova kičice od oštećenja izazvanih povredom, dok snažno indukovana totalna aktivnost POX potvrđuje značaj ovih enzima u procesima ćelijskih deoba, rasteњу i diferencijaciji ćelija tokom morfogeneze.

### **5.3. Uloga AGP u procesima morfogeneze *in vitro* kičice**

U cilju ispitivanja uloge AGP u morfogenetskim procesima *in vitro* kičice koristili smo nekoliko eksperimentalnih pristupa: istražen je efekat  $\beta$ GlcY na proces morfogeneze, količinu AGP u eksplantatima tokom morfogeneze i ekspresiju 5 *CeAGP* gena. Količina AGP je određena metodom radijalne difuzije, dok su kvalitativne



osobine AGP određene metodom ukrštene elektroforeze. Ekspresija 5 *CeAGP* gena je praćena tokom *in vitro* morfogeneze kičice pomoću qRT-PCR. Imunohistohemijskom metodom pomoću monoklonalnih antitela ispitana je lokalizacija AGP epitopa tokom SE.

### 5.3.1. Efekat $\beta$ GlcY na procese morfogeneze *in vitro* kičice

Rezultati ukazuju na to da je dodavanje  $\beta$ GlcY u hranljive podloge za ispitivanje morfogeneze uticalo na morfogenetske procese, direktnu i indirektnu organogenezu i SE, i dovelo do smanjenja broja adventivnih pupoljaka i somatskih embriona po eksplantatu (**Slika 25 a, b, c**). Postoji veliki broj podataka u literaturi o efektu  $\beta$ GlcY na različite procese *in vitro* regeneracije. Efekti  $\beta$ GlcY su varirali u zavisnosti od primenjenih koncentracija  $\beta$ GlcY, vremena izlaganja, tipa eksplantata i hranljive podloge. U najvećem broju istraživanja pokazano je da  $\beta$ GlcY inhibira proces SE (Chapman i sar., 2000; Lucau-Danila i sar., 2010), dok je inhibitorski efekat  $\beta$ GlcY na proces organogeneze pupoljaka pokazan u istraživanjima Orbovića i saradnika (2013). Deoba ćelija u suspenziji ćelija *Rosa sp.* je inhibirana u prisustvu 50  $\mu$ M  $\beta$ GlcY (Serpe i Nothangel, 1994). Rastenje korenova klijanaca *A. thaliana* je takođe inhibirano u prisustvu 10  $\mu$ M  $\beta$ GlcY (Ding i Zhu, 1997). Navedena istraživanja su ukazala na važne uloge AGP u različitim razvojnim procesima, gde je neophodna precizna i koordinisana regulacija ćelijskih deoba. Thompson i Knox (1998) su pretpostavili da  $\beta$ GlcY, vezivanjem i precipitacijom AGP u ćelijskom zidu, dovodi do inaktivacije AGP i samim tim sprečava obavljanje njihove funkcije (Thompson i Knox, 1998).

Uporednim ispitivanjem i poređenjem efekata  $\beta$ GlcY na različite morfogenetske procese iz odsečaka listova kičice, uočili smo da se ispitivani morfogenetski procesi razlikuju po osetljivosti na  $\beta$ GlcY, koji se po rastućoj senzitivnosti mogu poredati kao: direktna rizogeneza (neosetljiva) < indirektna organogeneza pupoljaka < direktna organogeneza pupoljaka < ISE (veoma osetljiva). Proces direktne rizogeneze na BM hranljivoj podlozi u mraku je neosetljiv na prisustvo  $\beta$ GlcY ovoj hranljivoj podlozi (**Slika 27c, d**).  $\beta$ GlcY je najviše uticao na proces SE (**Slika 25a**), što može ukazivati na to da poseban set AGP molekula koji su precipitirani sa ovim reagensom ima ulogu u SE. Do statistički značajnog smanjenja broja somatskih embriona dolazi već na

koncentraciji od 5  $\mu\text{M}$ , dok je na maksimalnoj primenjenoj koncentraciji  $\beta\text{GlcY}$  (150  $\mu\text{M}$ ) indukcija somatskih embriona je skoro potpuno inhibirana, sa smanjenjem od skoro 12 puta u odnosu na kontrolu (**Slika 25a**). Na delovima eksplantata koji su bili u kontinualnom kontaktu sa  $\beta\text{GlcY}$  nije dolazilo do formiranja somatskih embriona, već se formirao kalus (**Slika 26d**). Dobijeni rezultati su u skladu sa velikim brojem istraživanja u različitim eksperimentalnim sistemima, gde je pokazano da  $\beta\text{GlcY}$  inhibira proces SE čak u vrlo niskim primenjenim koncentracijama. U embriogenoj suspenziji ćelija *D. carota* pod uticajem  $\beta\text{GlcY}$  u koncentracijama višim od 3,5  $\mu\text{M}$  inhibirano je formiranje normalnih somatskih embriona i došlo je samo do pojave rizogeneze (Thompson i Knox, 1998). Somatski embrioni *Bactris gasipaes* se takođe nisu razvijali na eksplantatu koji je bio u kontaktu sa čvrstom podlogom koja je sadržala  $\beta\text{GlcY}$  u koncentraciji od 30  $\mu\text{M}$ , sugerišući da AGP imaju važnu ulogu u inicijalnom razvoju i formiranju somatskih embriona (Steinmacher i sar., 2012). Somatski embrioni u kulturi korenova hibrida *Cichorium* „474“ (*C. intybus* L.var. *sativum* x *C. endivia* L.var. *latifolia*) nastaju procesom direktne SE. Tokom ovog razvojnog procesa u normalnim *in vitro* uslovima, ćelije korena podležu antiklinim ćelijskim deobama, ali dodavanjem  $\beta\text{GlcY}$  dolazi do pojave periklinih ćelijskih deoba čime se zaustavlja proces razvića somatskih embriona (Chapman i sar., 2000), što ukazuje na to da je specifičan set AGP molekula potreban za formiranje bipolarnih somatskih embriona, kao i za razvoj izdanaka i orijentacije rasta korenova.

Tokom procesa direktne organogeneze pupoljaka do statistički značajnog smanjenja broja pupoljaka dolazi na 5  $\mu\text{M}$   $\beta\text{GlcY}$  (**Slika 25**). Za razliku od procesa ISE, smanjenje broja pupoljaka nastalih u procesu indirektno organogeneze na BM5Y hranljivoj podlozi je najmanje izraženo, što može biti posledica slabijeg vezivanja  $\beta\text{GlcY}$  za AGP koji imaju ulogu u diferencijaciji pupoljaka iz kalusa ili je proces indirektno organogeneze pupoljaka manje zavisen od AGP, i samim tim manje senzitivna na tretman sa  $\beta\text{GlcY}$  (**Slika 25b**). Statistički značajno smanjenje broja pupoljaka se moglo uočiti tek na koncentraciji  $\beta\text{GlcY}$  od 50  $\mu\text{M}$  (**Slika 25b**). Formiranje organogenih globula i pupoljaka na eksplantatima koji su bili u kontaktu sa podlogom koja je sadržala  $\beta\text{GlcY}$  potvrđuje manju osetljivost procesa indirektno organogeneze na tretman ovim reagensom (**Slika 26 b**). Slična zapažanja su zabeležena tokom indirektno organogeneze, kada je tretman sa  $\beta\text{GlcY}$  doveo do smanjenja

regenerativnog potencijala odsečaka izdanaka dve vrste *C. sinensis* (L.) Osbeck x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. i *C. paradisi*, odnosno do smanjenja broja adventivnih pupoljaka, što ukazuje na moguću ulogu AGP u regulaciji regeneracije izdanaka (Orbović i sar., 2013).

Iako pojava kalusa na eksplantatima gajenim na BM5 podlozi, u koju su dodate različite koncentracije  $\beta$ GlcY nije merena, uočeno je da je  $\beta$ GlcY uticao na povećanje pojave rizogenog kalusa na eksplantatima, posebno na svetlosti. Orbović i saradnici (2013) su uočili da je efekat  $\beta$ GlcY manje izražen u procesu formiranja kalusa na krajevima eksplantata, nego u procesu obrazovanja pupoljaka. Slična zapažanja su zabeležena u slučaju ISE, jer je  $\beta$ GlcY dodat u hranljivu podlogu u koncentraciji od 30  $\mu$ M značajno redukovao formiranje sekundarnih somatskih embriona vrste *B. gasipaes*, ali je istovremeno stimulisao formiranje kalusa (Steinmacher i sar., 2012). Rezultati ukazuju da  $\beta$ GlcY ima veći uticaj na determinisanje određenog razvojnog puta ćelija kalusa, poput SE, nego na proliferaciju ćelija mezofila lista kičice i formiranje kalusa.

Nasuprot našim rezultatima, dodavanje rastućih koncentracija  $\beta$ GlcY (0-75  $\mu$ M) u čvrstu hranljivu podlogu nije inhibiralo proces morfogeneze putem direktne organogeneze i DSE u kulturi korenova kičice (Trifunović i sar., 2014). Do formiranja kompletno razvijenih izdanaka došlo je na svim hranljivim podlogama koje su sadržale  $\beta$ GlcY, pri čemu je na hranljivim podlogama sa nižom koncentracijom  $\beta$ GlcY (25  $\mu$ M) broj direktnih regeneranata bio povećan u odnosu na kontrolu, dok na višim koncentracijama (50-75  $\mu$ M) vrednosti nisu bile statistički značajno različite od kontrolnih nakon 8 nedelja u kulturi. Različiti efekti  $\beta$ GlcY na proces morfogeneze koji su detektovani u dva eksperimentalna model sistema kičice možda mogu biti posledica sastava hranljive podloge (odnosno primenjenog regulatora rastenja i njegovih koncentracija), tipa eksplantata i dužine izlaganja  $\beta$ GlcY. Najveći broj eksperimenata koji se odnosio na istraživanje efekata  $\beta$ GlcY na različite razvojne procese je izveden dodavanjem  $\beta$ GlcY u suspenzije ćelija ili tečne kulture izolovanih organa. Kontinualni kontakt tkiva sa  $\beta$ GlcY u tečnoj kulturi je presudan za njegove efekte na proces regeneracije, što su pokazali Thompson i Knox (1998). Radi proučavanja efekata lokalizovane aplikacije  $\beta$ GlcY, pomenuti autori su male grupe proembriogenih ćelija iz embriogene suspenzije *D. carota* prebacili na polučvrstu hranljivu podlogu obogaćenu sa 5  $\mu$ M  $\beta$ GlcY i uočili stimulaciju rastenja pupoljaka i korenova, dok je u embriogenoj

suspenziji pri istoj primenjenoj koncentraciji  $\beta$ GlcY inhibiran razvoj normalnih somatskih embriona. Potpuna inhibicija procesa SE postignuta je u tečnoj hranljivoj podlozi u kojoj su gajeni odsecci korenova i listova cikoriје, dodavanjem ekstremno visoke koncentracije  $\beta$ GlcY (250  $\mu$ M) u trajanju od 11 dana gde su obe vrste eksplantata bile u neposrednom kontaktu sa  $\beta$ GlcY (Chapman i sar., 2000; Lucau-Danila i sar., 2010). Rezultati ovog rada su pokazali da je efekat  $\beta$ GlcY bio jače izražen kada su odsecci listova kičice gajeni na čvrstoj hranljivoj podlozi u odnosu na kulturu korenova kičice, što je najverovatnije uslovljeno samom prirodom eksplantata i interakcijom sa hranljivom podlogom, usled veće površine eksplantata koja je u kontaktu sa  $\beta$ GlcY, a posebno obodi izolovanog eksplantata koji predstavljaju mesta gde dolazi do formiranja kalusa i regeneranata. Na osnovu literature postoji samo jedan podatak gde je ispitan efekat  $\beta$ GlcY na indukciju SE iz odsečaka listova cikoriје (Lucau-Danila i sar., 2010). Pomenuti autori su jasno pokazali da  $\beta$ GlcY difunduje unutar lista cikoriје i da se već nakon 4 dana može uočiti oko pojedinih ćelija mezofila lista. U ovom radu izrazita crvena obojenost je detektovana uglavnom po obodu izolovanog eksplantata koji su gajeni na BM i kalusu koji se formirao na BM5 podlogama, u koje su dodate različite koncentracije  $\beta$ GlcY (**Slike 26 b, d; 27 f**). To ukazuje na to da je difundovanje  $\beta$ GlcY iz hranljive podloge u tkivo lista tokom eksperimenta najizraženije po obodu izolovanog eksplantata, gde je došlo do vezivanja  $\beta$ GlcY i stvaranja crvenog precipitata odnosno kompleksa  $\beta$ GlcY-AGP.  $\beta$ GlcY karakteriše velika molekulska masa i niski potencijal difuzije između ćelija, tako da može ući u međućelijski prostor, ali je suviše veliki molekul i ne može proći kroz ćelijsku membranu (Serpe i Nothangel, 1994).

Različiti efekti  $\beta$ GlcY mogu biti posledica njegove interakcije sa pojedinim AGP molekulima uključenim u procese organogeneze i SE. Primenjen kod klijanaca *A. thaliana*,  $\beta$ GlcY nije mogao da uđe centralni cilindar i njegov efekat je uočen samo u epidermalnim ćelijama korena, odnosno  $\beta$ GlcY je izazvao dehidrataciju epidermalnih ćelija korena, dok na korensku kapu i meristem nije delovao, što ukazuje na to da osetljivost na  $\beta$ GlcY varira između različitih tkiva verovatno usled razlika u reaktivnosti različitih AGP u odnosu na  $\beta$ GlcY (Willats i Knox, 1996). Na osnovu toga je pretpostavljeno da AGP koji se vezuju za  $\beta$ GlcY predstavljaju podgrupu u okviru veće AGP familije (Willats i Knox, 1996). Procenjeno je da  $\beta$ GlcY vezuje 50-100 različitih

AGP molekula (Ellis i sar., 2010). Iako je nedavno otkriveno da  $\beta$ GalY vezuje  $\beta$ -1,3-galaktooligosaharide koji sadrže više od sedam galaktoznih ostataka (Kitazawa i sar., 2013), mehanizam delovanja ovog reagensa, odnosno način na koji utiče na funkciju AGP je i dalje nepoznat. Visok afinitet AGP za  $\beta$ GlcY i  $\beta$ GalY vodi ka pretpostavci da bi se slične interakcije mogle dešavati u ćelijskom zidu, pri čemu bi se AGP vezivali sa polisaharidima ćelijskog zida koji u svom molekulu imaju  $\beta$ -glukozil i  $\beta$ -galaktozil ostatke (celuloza, kaloza, ksiloglukan, pektin), kao i sa drugim AGP molekulima. Ove interakcije mogu biti važne za procenu mnogih funkcija AGP (Seifert i Roberts, 2007; Kitazawa i sar., 2013). S obzirom da  $\beta$ -1,3-galaktooligosaharidi predstavljaju konzervisan deo ugljenohidratne komponente svih AGP molekula, ovaj pristup je nespecifičan, jer njegovom primenom ne možemo dobiti informacije o ulozi pojedinih AGP molekula u indukciji morfogeneze *in vitro* iz odsečaka listova.

### 5.3.2. Kvantifikacija AGP tokom procesa morfogeneze *in vitro* kičice

Sadržaj AGP je određivan u odseccima listova kičice tokom različitih morfogenetskih procesa *in vitro*, na svetlosti i u mraku. Uočeno je povećanje sadržaja AGP u svim odseccima listova, bez obzira na hranljivu podlogu i uslove osvetljenja na kojima su gajeni. Na hranljivim podlogama sa regulatorima rasteња, gde je došlo do formiranja embriogenog kalusa, dinamika povećanja količine AGP je bila različita (Slika 28). Tokom prvih sedam dana količina AGP je bila smanjena u eksplantatima gajenim u mraku na BM6 hranljivoj podlozi, za razliku od eksplantata koji su gajeni na svetlosti na BM5 gde je detektovano povećanje količine AGP, što se može dovesti u vezu sa dediferencijacijom i formiranjem kalusa koji su bili izraženiji u kulturama koje su gajene na svetlosti (Slika 9). Sa formiranjem somatskih embriona sadržaj AGP u eksplantatima je u porastu. Na početku uspostavljanja embriogene kulture *E. pulcherrima* količina AGP u kalusu je bila smanjena i povećavala se sa razvojem somatskih embriona (Saare-Surminski i sar., 2000), kao i tokom ISE iz odsečaka listova kičice gajenih na BM6 hranljivoj podlozi u mraku. Povećanje koncentracije AGP detektovano je u embriogenom kalusu pamuka, gde se nalazi tri puta veća količina AGP koji su izolovani pomoću  $\beta$ GlcY u odnosu na neembriogeni kalus (Poon i sar., 2012). Tokom direktne rizogeneze u mraku, količina AGP u eksplantatima gajenim na BM

hranljivim podlogama, se postepeno povećavala. Tokom direktne organogeneze pupoljaka na svetlosti količina AGP je uglavnom bila smanjena, osim 28. dana kada su na eksplantatima uočeni diferencirani pupoljci. Orbović i saradnici (2013) su pokazali da je sadržaj AGP u eksplantatima dve vrste *C. sinensis* (L.) Osbeck x *P. trifoliata* (L.) Raf. i *C. paradisi* skoro identičan iako su se razlikovali u regenerativnom potencijalu. Kao ekstracelularni proteini, AGP se izlučuju u hranljive podloge na kojima su gajene embriogene i neembriogene kulture. Najveći broj podataka u literaturi, koji se tiče određivanja količine AGP, dobijen je sa suspenzijama ćelija i tečnim kulturama korenova i određivanja količine ekstracelularnih AGP u hranljivoj podlozi. Pomenuti literaturni podaci ukazuju na korelaciju između količine i sastava AGP u hranljivoj podlozi i embriogenog potencijala ćelijskih linija. Chapman i saradnici (2000) su pokazali da se količina AGP povećava u hranljivoj podlozi na kojoj su gajene embriogene kulture, dok ovo povećanje nije uočeno u hranljivim podlogama na kojima su gajene neembriogene kulture.

Dodavanje  $\beta$ GlcY u hranljive podloge nije uticalo bitno na količinu AGP u odsečcima listova kičice tokom morfogeneze, iako je ovaj reagens izazvao smanjenje regenerativnog potencijala eksplantata gajenih na hranljivim podlogama sa regulatorima rasteња. Precipitacija AGP sa  $\beta$ -GlcY dovela je do redukcije sadržaja AGP u ćelijskom zidu od 61,14% i totalnu inhibiciju sekrecije AGP u hranljivoj podlozi kulture ćelija *Beta vulgaris* (Capataz-Tafur i sar., 2011). Prisustvo  $\beta$ -GlcY je uticalo na smanjenje količine AGP u tečnom hranljivoj podlozi u kome su gajeni somatski embrioni *Bactris gasipaes* (Steinmacher i sar., 2012). Sa povećanjem koncentracije  $\beta$ -GlcY u podlozi smanjivala se količina AGP u hranljivoj podlozi (Chapman i sar., 2000). U kulturi korenova kičice sadržaj AGP u regenerisanim pupoljcima i korenovima je bio povećan na čvrstim podlogama sa višim koncentracijama  $\beta$ -GlcY (25, 50 i 75  $\mu$ M) (Tifunović i sar., 2014).

### **5.3.3. Kvalitativne osobine arabinogalaktanskih proteina tokom procesa morfogeneze *in vitro* kičice**

AGP koji su izolovani iz odsečaka listova kičice gajenih tokom 15 dana na BM5 hranljivoj podlozi, na svetlosti, odnosno 20 i 28 dana na BM i BM5Y5 hranljivim

podlogama, u mraku, su razdvojeni na osnovu veličine i naelektrisanja pomoću ukrštene elektroforeze. Gumiarabika, koja služi kao referentni arabinogalaktanski protein, je razdvojena tokom elektroforeze u dve komponente AGP, sa Rf vrednostima od 0,425 i 0,671 (**Slika 31d**), što odgovara već potvrđenom precipitacionom profilu gumiarabike (van Holst i Clarke, 1986; Wiśniewska i Majewska-Sawka, 2007). Naši rezultati ukazuju na to da se AGP izolovani iz odsečaka listova kičice gajenih na pomenutim hranljivim podlogama odlikuju izuzetno velikom elektroforetskom mobilnošću i međusobno skoro identičnim precipitacionim profilima, sa po jednim maksimumom, a potpuno različitim u odnosu na gumiarabiku (**Slika 31a, b, c**). Visok kapacitet ovih molekula da migriraju ka anodi uslovio je precipitacione maksimume sa Rf vrednostima od 0,750, 0,821 i 0,875, što je ukazalo na to da dominantne komponente izolovanih AGP imaju visoku elektroforetsku mobilnost. Elektroforetskoj mobilnosti AGP u najvećoj meri doprinosi visok sadržaj uronskih kiselina u ugljeno-hidratnom delu molekula AGP (van Holst i Clarke, 1986). U ovom radu je imunohistohemijskom lokalizacijom pokazano intenzivno prisustvo AGP sa LM2 epitopom (**Slika 32a, b, c, d**), koji sadrži  $\beta$ -vezane ostatke glukuronske kiseline, u koji su gajeni na BM hranljivoj podlozi, kao i tokom SE, što objašnjava dobijene precipitacione profile AGP kičice.

Pozicija i broj maksimuma na elektroforetskom profilu dobijenom pomoću ukrštene elektroforeze su povezani sa morfofenetskim osobinama tkiva gajenih *in vitro* (Wiśniewska i Majewska-Sawka, 2007). Ispitivanja elektroforetskih osobina AGP izolovanih iz hranljive podloge za gajenje embriogene i neembriogene ćelijske suspenzije *D. carota* su ukazala na razlike između AGP izlučenih u hranljivu podlogu, koje su se ogledale u različitim precipitacionim profilima i Rf vrednostima (Kreuger i van Holst, 1993). Elektroforetski profili AGP izolovanih iz embriogenog i neembriogenog kalusa *E. pulcherimma* su takođe ukazivali na postojanje različitih formi AGP koje se vezuju za  $\beta$ GlcY (Saare-Surminski i sar., 2000). Nasuprot tome, Wiśniewska i Majewska-Sawka (2007) nisu uočile razlike između AGP izolovanih iz hranljive podloge za gajenje embriogenih i neembriogenih kultura *Beta vulgaris*, čiji su precipitacioni profili imali jedan maksimum i skoro identičnu Rf vrednost. Takođe, elektroforetski profili AGP izolovanih iz ćelija embriogenih i neembriogenih kultura *D. carota* su bili identični, sa širokim maksimumom i Rf vrednošću 0,5, za razliku od AGP izolovanih iz hranljive podloge ovih kultura (Kreuger i van Holst, 1993). U našem

istraživanju razlike koje su detektovane između Rf vrednosti ispitivanih odsečaka listova mogle bi ukazivati na različit sastav AGP molekula u ovim tkivima, odnosno na ulogu AGP molekula koju bi mogli imati u različitim morfogenetskim procesima. Iako su AGP heterogena grupa proteina, svako tkivo sadrži specifičan set AGP molekula (van Holst i Clarke, 1986; Saare-Surminski i sar., 2000).

U svakom slučaju, ovom metodom je teško detektovati delikatne promene AGP sastava koje bi mogle biti od velikog funkcionalnog značaja (Ding i Zhu, 1997). Uporednim ispitivanjem AGP pomoću ukrštene elektroforeze i monoklonalnih antitela pokazano je da u tkivu postoje AGP koji se ne vezuju za  $\beta$ GlcY, a čije je prisustvo dokazano na osnovu vezivanja sa specifičnim antitelima (Willlats i Knox, 1996; Saare-Surminski i sar., 2000). Radijalna difuzija i ukrštena elektroforeza su metode pomoću kojih se brzo mogu odrediti količina i naelektrisanje AGP tokom različitih razvojnih procesa (Gell i sar, 1986), ali se pomoću ovih metoda postiže ograničeno sagledavanje mogućih funkcija AGP.

#### **5.3.4. Imunohistohemijska lokalizacija AGP tokom procesa morfogeneze *in vitro* kičice**

U ovom radu je urađena i imunohistohemijska lokalizacija AGP epitopa pomoću tri specifična monoklonalna antitela (LM2, JIM4 i JIM13) radi praćenja njihovog prisustva u ćelijama eksplantata i regeneranata tokom SE *in vitro* iz odsečaka listova kičice. Ova antitela reaguju sa ugljeno-hidratnim delovima AGP molekula.

AGP sa LM2 epitopom su detektovani u ćelijama lisnog odsečka koji je gajen 7 dana na BM hranljivoj podlozi, zatim u meristemskim ćelijama, proembriogenim strukturama i globularnom somatskom embrionu (**Slika 32a, b, c, d**). Iako su AGP sa LM2 epitopom prisutni u ćelijskim zidovima svih ćelija lista, jasno je uočena akumulacija ovih epitopa u meristemskim centrima u odnosu na okolno tkivo mezofila. Tokom kasnijih faza razvića somatskih embriona kičice AGP sa LM2 epitopom nestaju. Izraženo prisustvo AGP sa LM2 epitopom u embriogenom tkivu i ranim stadijumima razvića somatskih embriona ukazuje na moguću ulogu AGP molekula sa LM2 epitopom tokom SE iz odsečaka listova kičice. Slične rezultate su dobili Pilarska i saradnici (2013) gde je reakcija LM2 epitopa bila veoma izražena u meristemskim ćelijama iz



kojih su se razvili somatski embrioni *Trifolium nigrescens*, ali u kasnijim stadijumima razvića embriona ova reakcija nije uočena. Imunohistohemijska istraživanja su pokazala da globularne stadijume somatskih embriona različitih vrsta karakteriše specifičan obrazac AGP lokalizacije. AGP sa LM2 epitopom imaju ključnu ulogu u indukciji ranih embrionalnih stupnjeva kod *E. pulcherimma* i uočeni su na površini protodermalnih ćelija globularnog somatskog embriona. Prelaskom embriona u starije stadijume razvića nije primećeno značajnije prisustvo ovog epitopa (Saare-Surminski i sar., 2000). Postoji značajna akumulacija AGP sa JIM4 antitelom u protodermu globularnih embriona *D. carota* (Stacey i sar., 1990). JIM13 epitop se pojavljuje u protodermu somatskih embriona vrste *Bactris gasipaes* (Steinmacher i sar, 2012), dok se LM2, JIM13 i JIM16 epitopi nalaze na površini ćelija budućeg protoderma somatskih embriona hibrida *Cichorium* „474“ (Chapman i sar., 2000). Lokalizacija AGP i pektinskih epitopa u zavisnosti od pozicije ćelija detektovana je u kalusu *T. aestivum* tokom organogeneze, gde je prisustvo JIM14, JIM15 i JIM4 epitopa uočeno u velikim parenhimskim ćelijama na periferiji neorganogenog kalusa, dok su sa početkom regeneracije LM2 epitopi detektovani u meristemskim ćelijama lokalizovanim u dubljim slojevima kalusa (Konieczny i sar., 2007). U našem istraživanju izraženo prisustvo AGP sa LM2 epitopom je uočeno u svim ćelijama globularnog embriona kičice (**Slika 32a**), kao što je pokazano i kod banane (*Musa* spp.AAA cv. „Yueyoukang 1“), gde je jak signal LM2, LM14 i JIM16 epitopa detektovan u svim ćelijama globularnog embriona (Pan i sar., 2011). Pomenuti autori su koristili 16 monoklonalnih antitela za istraživanje lokalizacije AGP epitopa tokom SE banane i utvrdili da su u istim razvojnim stupnjevima SE prisutni različiti AGP epitopi (Pan i sar., 2011).

Karakteristično je da se prisustvo AGP sa LM2 epitopom uočava, osim u embriogenom tkivu i globularnim somatskim embrionima, i u ćelijskim zidovima skoro svih ćelija lisnog eksplantata koji je gajen 7 dana na BM hranljivoj podlozi, a reakcija ovog epitopa je posebno izražena u ćelijama provodnih snopića (**Slika 32a**). Pilarska i saradnici (2013) su pokazali da se AGP sa LM2 epitopom mogu uočiti tokom razvoja somatskih embriona *T. nigrescens*, ali i u parenhimskim ćelijama neembriogenog kalusa. Ovi rezultati mogu ukazivati na različite uloge AGP sa LM2 epitopom, koji sadrži  $\beta$ -vezane ostatke glukuronske kiseline (Smallwood i sar., 1996), osim na ulogu tokom indukcije SE. LM2 epitop može biti deo ugljeno-hidratne komponente različitih

AGP molekula, odnosno AGP sa različitim proteinskom osnovom, koje imaju različite funkcije. To znači da jedno specifično monoklonalno antitelo može prepoznati više AGP molekula ukoliko su njihove proteinske osnove glikozilovane ugljeno-hidratnim lancima koji sadrže iste epitope (Gao i Showalter, 2000; Schultz i sar., 2000).

Tokom daljeg razvića somatskih embriona kičice detektovana je pojava novih epitopa. U ćelijama somatskih embriona kičice na ranom kotiledonarnom stadijumu razvića bili su prisutni AGP bogati JIM4 epitopom (**Slika 32e**). Nasuprot ovim rezultatima, JIM4 epitop je opisan kao mogući rani marker sticanja embriogene kompetencije u ćelijama kalusa *Z. mays* (Šamaj i sar., 1999), jer je detektovan samo na površini embriogenih ćelija, dok u ćelijama neembriogenog kalusa nije detektovan. AGP koji imaju specifičan epitop za koji se vezuje JIM13 monoklonalno antitelo su prisutni kod kompletno razvijenih somatskih embriona kičice na kotiledonarnom stadijumu razvića (**Slika 32f**). Prisustvo AGP sa JIM13 epitopom je detektovano tokom inicijalnih faza SE, u proembriogenim strukturama smrče (Filonova i sar., 2000) i embriogenim ćelijama banane (Pan i sar., 2011). Kod kompletno razvijenih somatskih embriona banane AGP sa JIM13 epitopom su detektovani samo u vaskularnim elementima (Pan i sar., 2011). Nasuprot tome, tokom embriogeneze kod vrste *Brassica napus*, AGP sa JIM13 epitopom se javljaju u proembriogenim strukturama i globularnim somatskim embrionima dok u embriogenim ćelijama nisu detektovani (Namasivayam i sar., 2010). Tokom androgeneze *Brassica napus* cv. Topas pokazano je da AGP sa JIM13 epitopom mogu biti uključeni u formiranje embriona (Tang i sar., 2006).

Akumulacija AGP sa LM2 epitopom u meristemskim ćelijama i izraženo prisustvo u globularnom somatskom embrionu, kao i pojava novih epitopa, JIM4 i JIM13, u kasnijim fazama razvića somatskog embriona, ukazuju na to da je lokalizacija AGP epitopa razvojno regulisana tokom SE kičice, kao što je već pokazano kod *D. carota* (Stacey i sar., 1990), hibrida *Cichorium* „474“ (Champan i sar., 2000), *Musa* sp. (Pan i sar., 2011) i drugih vrsta. AGP epitopi mogu predstavljati specifične razvojne markere embriogenih ćelija i/ili somatskih embriona (Pilarska i sar., 2013). Na primer, epitopi AGP koji se nalaze na površini embriogenih ćelija *D. carota* reaguju sa JIM8 antitelom, dok kod neembriogenih ćelija ova reakcija izostaje, što je dokaz da su ovi

proteini markeri veoma ranog stadijuma SE neposredno posle indukcije (McCabe i sar., 1997).

### **5.3.5. Sekvenciranje *AGP* gena kičice i karakterizacija proteinskih sekvenci AGP**

U cilju identifikacije gena koji kodiraju proteinske delove AGP molekula korišćeni su različiti pristupi, u zavisnosti od dostupnih podataka. Schultz i saradnici (1998) su identifikovali 5 pretpostavljenih *AGP* gena *A. thaliana*, *AtAGP1* - *AtAGP5*, poređenjem strukture izvedenih proteinskih sekvenci sa AGP drugih vrsta biljaka. Kombinacijom dva pristupa, proteomskog i genomskog pristupa, Schultz i saradnici (2000) su identifikovali 15 *AGP* gena koji kodiraju proteinski deo klasičnih AGP, a među njima i AG peptide i jedan AGP koji se razlikovao od ostalih identifikovanih, jer je pored dva AGP domena imao i dva FAS domena (Kawamoto i sar., 1998). Nakon prečišćavanja AGP iz listova i korenova *A. thaliana*, njihove precipitacije sa  $\beta$ GlcY i deglikozilacije, peptidne sekvence su sekvencirane Edmanovom degradacijom. Sekvencirane peptidne sekvence su korišćene za pretraživanje EST (eng. „expressed sequence tags“) baze podataka radi identifikacije *AGP* gena. Genomski podaci su bili jako dragoceni u identifikaciji *AGP* gena *A. thaliana* (Schultz i sar., 2002; Showalter i sar., 2010) i *O. sativa* (Ma i Zhao, 2010). Prva obimna bioinformatička analiza radi identifikacije *AGP* gena u genomu *A. thaliana* omogućila je identifikaciju 4 različite grupe AGP: 13 klasičnih AGP, 3 AGP bogata Lys, 10 AG peptida i 21 FLA (Schultz i sar., 2002). U cilju identifikacije klasičnih AGP i AG peptida, ovi autori su tražili sekvence sa većom zastupljenošću Pro, Ala, Ser i Thr (PAST) i sa predviđenim prisustvom N-signalnog peptida, dok su FLA pretraživali na osnovu prisustva fasciklin domena. Sve sekvence su zatim analizirane radi predikcije prisustva GPI-signalne sekvence. Na sličan način, pretraživanjem baze anotiranih proteinskih sekvenci pirinča na osnovu sastava aminokiselina, dužine i prisustva konzervisanih domena, Ma i Zhao (2010) su identifikovali 69 članova AGP familije pirinča. Showalter i saradnici (2010) su razvili BIO OHIO - program za identifikaciju, klasifikaciju i analizu svih HGRP, koji se zasniva na traženju sekvenci sa sastavom aminokiselina karakterističnim za ove proteine i pojedinih motiva koji su karakteristični za HGRP. Pomoću ovog programa

identifikovali su ukupno 85 AGP kod *A. thaliana*, uključujući 22 klasična AGP, 3 AGP bogata Lys, 16 AG peptida, 21 FLA, 17 plastocijanin AGP i 6 drugih himernih AGP.

U ovom radu smo polazeći od sekvenciranog i rekonstruisanog transkriptoma korena i lista kičice identifikovali 4 *AGP* gena kičice (*CeAGP1*, *CeAGP2*, *CeAGP3* i *CeAGP4*). AGP sekvence kičice su identifikovane na osnovu sličnosti sa AGP drugih biljaka, pomoću algoritma BLAST (**Tabela 14**). S obzirom da proteinski deo AGP molekula kodiraju multigenske familije, možemo pretpostaviti da ovih 4 *AGP* gena predstavlja jedan deo multigenske familije AGP kičice. Korišćenje transkriptoma kao polazne osnove za identifikaciju gena ima izvesna ograničenja, jer omogućava identifikaciju samo onih gena koji su aktivno eksprimirani u datom tkivu, u našem slučaju u transkriptomu korena i lista kičice. Sekvenciranjem transkriptoma drugih organa i tkiva kičice, moguće bi bilo identifikovati veći broj AGP gena.

Pretraživanjem NCBI proteinske baze podataka prema zadatim transliranim proteinskim sekvencama AGP kičice i identifikacijom regiona lokalne sličnosti između sekvenci upotrebom PROTEIN BLAST algoritma, utvrdili smo prisustvo konzervisanih domena u proteinskim sekvencama AGP kičice. *CeAGP1*, *CeAGP2* i *CeAGP4* sadrže FAS domen, *CeAGP3* poseduje DUF1070 domen dok *CeAGP5* sadrži PH-GRAM\_WBP2 domen (**Tabela 16**). Iako je broj klasičnih AGP kod istraženih multigenskih familija *A. thaliana* i *O. sativa* znatan u odnosu na ostale grupe AGP, pristupom koji smo koristili, BLAST metodom, identifikovali smo samo AGP koji sadrže konzervisane proteinske domene (FAS, DUF1070) ali ne i klasične AGP molekule, jer sekvence sa AG glikomodulima nisu konzervisane. Poređenjem 15 proteinskih sekvenci klasičnih AGP koje su dobili na osnovu nuleotidnih sekvenci identifikovanih *AGP* gena, Schultz i saradnici (2000) su pokazali da između ovih sekvenci postoji niska identičnost, koja je u najvećem broju slučajeva iznosila manje od 40%. AG peptidi predstavljaju klasične AGP sa kratkim AGP domenom, i većinu AG peptida nije moguće identifikovati BLAST metodom. U ovom istraživanju smo uočili da je BLAST metodom moguće identifikovati jednu grupu AG peptida koja se javlja kod znatnog broja biljaka a u svojoj sekvenci ima konzervisane GPI sekvencu, koja u najvećoj meri čini DUF1070 domen.

Najveći broj AGP koje smo izolovali BLAST metodom na osnovu njihovih konzervisanih fasciklin domena, pripada FLA (**Tabela 16**). Identifikovano je ukupno 3

člana FLA familije kičice, CeAGP1, CeAGP2 i CeAGP4, od kojih samo CeAGP2 ima kompletnu sekvencu, sa 461 aminokiselinom, dok su sekvence CeAGP1 i CeAGP4 delimične, sa više od 224 i 328 aminokiselina. U genomima biljaka postoji veliki broj gena koji kodiraju FLA sa jednim ili dva fasciklin domena, 21 kod *A. thaliana* (Johnson i sar., 2003), 27 kod *O. sativa* (Ma i Zhao, 2010), 34 kod *T. aestivum* (Faik i sar., 2006), 33 kod *Brassica rapa* (Jun i Xiaoming, 2012) i drugih. Veličina FLA varira od 247 do 462 aminokiseline *A. thaliana* (Showalter i sar., 2010). Jedna od karakteristika AGP je prisustvo N-signalne sekvence, čije je prisustvo predviđeno kod svih ispitivanih FLA kičice (**Slika 39**). Ova grupa proteina je veoma heterogena i klasifikovani su na osnovu broja AGP i FAS domena i prisustva GPI sidra (Johnson i sar., 2003; Ma i Zhao, 2010). CeAGP1 i CeAGP4 imaju jedan FAS i dva AGP domena i predviđeno prisustvo GPI signalne sekvence (**Slike 1, 39**). CeAGP2 poseduje dva FAS i jedan AGP domen, i nema GPI signalnu sekvencu (**Slike 1, 39**). Na osnovu prisustva C terminalne hidrofobne signalne sekvence predviđeno je da 14 FLA od ukupno 21 FLA *A. thaliana* imaju GPI-sidro. Najmanje 77,78% od ukupnog broja od 27 FLA *O. sativa* je predviđeno da sadrži GPI sidro (Ma i Zhao, 2010). Sastav aminokiselina zrelih proteina, bez fasciklin domena, CeAGP1, CeAGP2 i CeAGP4 kičice potvrđuje da se radi o AGP proteinima, jer su Pro/Hyp, Ala, Ser i Thr, karakteristične za AGP domen, najzastupljenije (**Tabela 17**). Fasciklin domeni su visoko konzervisane sekvence za koje se smatra da predstavljaju adhezivne domene, putem kojih se ostvaruje fizički kontakt FLA sa susednim ćelijama. AGP domen predstavlja mesto za O-glikozilaciju i pretpostavlja se da ima ulogu u interakcijama AGP sa ugljenim hidratima (Kitazawa i sar., 2013).

Iako se identifikovani FLA kičice razlikuju u pogledu svoje dužine i broja AGP i FAS domena, kod svih se u okviru FAS domena, na njegovim krajevima, uočavaju visoko konzervisane sekvence od oko 10 aminokiselina, označene kao H1 i H2, i adhezivni motiv domen koji se nalazi između ovih sekvenci (**Slike 34, 35, 37**). Ove konzervisane sekvence su karakteristične za sve fasciklin domene (Kawamoto i sar., 1998). U okviru H1 sekvenci fasciklin domena kičice je na prvoj poziciji aminokiselina Thr, čija je pozicija konzervisana kod FLA biljaka (Faik i sar., 2006). Kod najvećeg broja FLA biljaka na šestoj poziciji iza Thr se nalazi Asp/Asn/Glu, što se uočava i kod FLA kičice, gde je na ovoj poziciji Asp osim kod CeAGP2 gde se umesto Asp na šestoj

poziciji H1 sekvence prvog fasciklin domena nalazi Asn. Za H2 sekvencu je karakteristično da se na C-terminusu nalaze hidrofobne aminokiseline, kao što su Val, Leu i Ile (Johnson i sar., 2003, Lafarquette i sar., 2004, Liu i sa., 2008). Ova konzervisana karakteristika se uočava i kod kičice, ali se pored pomenutih aminokiselina sreće i Phe (**Slika 35, 37**). Takođe, dok je pozicija His kod najvećeg broja fasciklin domena životinja konzervisana, kod biljaka se kao i kod kičice, na ovoj poziciji sreću osim His i Phe, Tyr i Gln (Faik i sar., 2006). Adhezivni motiv čini motiv Tyr-His, osim kod CeAGP1 gde je prisutan motiv Phe-His, koji se nalazi i u strukturi FLA *P. tremula* x *P. alba* (Lafarquette i sar., 2004). Uloga adhezivnog motiva je pokazana u animalnim ćelijama, u vezivanju integrina, koji predstavljaju transmembranske mostove između ECM i citoskeleta animalnih ćelija (Kawamoto i sar., 1998; Kim i sar., 2002).

CeAGP1 za razliku od druga dva identifikovana FLA kičice, u svojoj primarnoj strukturi ima i kratak bazni region bogat Lys, koji se nalazi u okviru AGP domena (**Tabela 16; Slike 34, 39**). Ovaj region se nalazi i kod AGP2 *G. hirsutum* (ABR68797.1) (Liu i sar., 2008), gde je takođe jako kratak, predstavljen sa 6 aminokiselinskih ostataka. Kod najvećeg broja klasičnih AGP bogatih Lys, ovaj region čini veći broj ostataka Lys (Gao i sar., 1999; Sun i sar., 2005).

Prisustvo GPI signalne sekvence predviđeno je kod CeAGP3, a kod CeAGP1 i CeAGP4 se može pretpostaviti na osnovu poređenja sa FLA drugih biljaka (**Slike 34, 36, 37**). CeAGP3 pripada grupi AG peptida, za koje se smatra da predstavljaju osnovnu formu AGP jer osim AGP domena ne sadrže druge domene koji bi uticali na njihovu funkciju (Ellis i sar., 2010). Aminokiselinski sastav AGP domena, gde su najzastupljenije aminokiseline Pro, Ala i Ser, jasno ukazuje da CeAGP3 predstavlja AGP (**Tabela 17**). Predviđeno je postojanje N-signalne sekvence i GPI-signalne sekvence u strukturi ovog proteina, što ukazuje na to da se radi o proteinu za eksport koji će biti sekretovan van ćelije i pričvršćen za ćelijsku membranu pomoću GPI-sidra. Međutim, pomoću algoritma Protein Blast utvrdili smo da CeAGP3 pokazuje sličnost sa velikim brojem AG peptida, AGP ali i hipotetičkih proteina sa nepoznatom funkcijom, jer im je odlika prisustvo DUF1070 domena. Takođe se moglo primetiti da se radi o manjim proteinima, jer dužina ovih proteina sa DUF domenom iznosi od 61 do 75 aminokiselina. Veličina AG peptida veličina varira od 58 do 87 aminokiselina kod *A.*

*thaliana* (Showalter i sar., 2010). Poređenjem primarnih struktura ortologih proteina različitih vrsta biljaka sa DUF1070 domenom, uočeno je da ovaj domen ima konzervisanu strukturu (**Slika 36**). Domen DUF1070 obuhvata deo AGP domena i kompletnu GPI-signalnu sekvencu na C-terminusu kod CeAGP3. Najveći deo ovog domena čini GPI signalna sekvencija koja ima konzervisanu strukturu (Schultz i sar., 1998; Eisenhaber i sar., 1998). CeAGP3 ima veliku homologiju sa tri AG peptida *A. thaliana*, AGP16, AGP20 i AGP22, koji sadrže DUF1070 domen (**Slika 36**). Konstrukcijom filogenetskih stabala radi utvrđivanja filogenetske povezanosti AGP *O. sativa* sa AGP drugih biljnih vrsta, među AG peptidima *O. sativa* i *A. thaliana* se izdvojila jedna klada AG peptida sa konzervisanom sekvencom SDGT (Ma i Zhao, 2010). U sekvenci ovih AG peptida (AtAGP16, AtAGP20, AtAGP22, AtAGP41, OsAGP15, OsAGP16, OsAGP20 i OsAGP23), je konzervisani DUF1070 domen, osim kod OsAGP26. Sekvencija SDGT se inače može uočiti i strukturi CeAGP3 i svih poređenih proteina. Možemo pretpostaviti da su očuvane aminokiselinske pozicije ključne za biološku funkciju ovih proteina, međutim funkcija ovog domena još uvek nije poznata, po čemu su inače različiti DUF domeni označeni (eng. „domains of unknown function“). Smatra se da je više od 20% svih proteinskih domena trenutno anotirano kao DUF (Goodacre i sar., 2013). Konzervisana struktura i prisustvo ovog domena kod proteina značajnog broja vrsta biljaka, gde ovaj domen predstavlja jedini konzervisani domen, mogla bi ukazivati na važnu biološku ulogu ovog domena.

Za razliku od gore navedenih pretpostavljenih proteinskih sekvenci AGP kičice, za koje smo ustanovili postojanje strukturnih odlika karakterističnih za AGP, kod CeAGP5 proteina ove karakteristike nisu potvrđene. Kod ovog proteina nije predviđeno postojanje N-signalne sekvence, kao ni AGP domena. Upoređivanjem aminokiselinske sekvence CeAGP5 kičice sa AGP drugih biljnih vrsta iz NCBI baze proteinskih sekvenci pomoću programa Protein Blast, utvrđeno je slaganje sa proteinima od kojih su samo neki anotirani kao AGP (AGP *Z. mays* (NP\_001147556.1 i NP\_001148905.1), klasični AGP *G. manicata* (ADP88925.1) i AGP *M. truncatula* (KEH20267.1)), dok najveći broj predstavlja hipotetičke proteine (**Slika 38**). CeAGP5 sadrži PH-GRAM\_WBP2 domen, kao i svi poređeni proteini. PH-GRAM\_WBP2 domen je kompleksni domen koji sadrži N-terminalni PH-GRAM domen i C-terminalni WWbp domen. WW vezujući protein 2 (WBP2) ima brojne uloge, između ostalih ulogu u

regulaciji funkcije citoskeleta i ćelijskih deoba. GRAM domen je pronađen kod glikoziltransferaza, miotubularina i drugih proteina asociranih za membranu, a njihova uloga je u intracelularnom vezivanju proteina ili lipida, koje ima važnu ulogu u procesima asociranim za membranu (Doerks i sar., 2000; Jiang i sar., 2008). GRAM domen je deo većeg motiva sa plekstrin homolognim (PH) domenom. Plekstrin homologni domen je pronađen kod proteina eukariota sa širokim opsegom funkcija, uključenih u unutarćelijsko prenošenje signala i organizaciju citoskeleta. Najpoznatija uloga ovog domena je vezivanje fosfatidilinozitol lipida i ciljani prenos proteina ka membrani (Xu i sar., 2010), odnosno lokalizacija proteina ka specifičnim ćelijskim lokacijama, pa je predloženo da je ovaj domen opšti ciljajući ili „*adaptor*“ domen (Blomberg i sar, 1999).

### **5.3.6. Kvantifikacija ekspresije *AGP* gena tokom procesa morfogeneze *in vitro* kičice**

Antitela koja prepoznaju ugljeno-hidratne delove AGP molekula i  $\beta$ GlcY su široko korišćeni za istraživanje uloge AGP *in planta* i u kulturi tkiva (Seifert i Roberts, 2007; Ellis i sar, 2010), ali ovi pristupi nisu omogućavali određivanje funkcije pojedinačnih AGP (Tan i sar., 2012). Monoklonalna antitela prepoznaju određen AGP epitop, koji je često nepoznat (**Tabela 1**) i može biti sastavni deo različitih AGP molekula, odnosno sa različitom proteinskom osnovom. Ova ograničenja su delimično prevaziđena uz primenu tehnika molekularne biologije. Identifikacija gena koji kodiraju proteinske delove AGP molekula, kao i detekcija specifičnih obrazaca ekspresije i promena u nivoima transkripcije ovih gena su bile od pomoći u usmeravanju primene eksperimentalnih pristupa za otkrivanje njihove funkcije, podvlačeći značaj dostupnosti i analize transkripcionih podataka (Tan i sar., 2012).

Analiza ekspresije gena tokom morfogenetskih procesa, a posebno tokom SE može obezbediti informacije za bolje razumevanje ovog procesa (Feher i sar., 2003). U ovom radu određeni su nivo i dinamika transkripcije identifikovanih i sekvenciranih *CeAGP* gena tokom morfogeneze *in vitro* kičice. Karakteristika skoro polovine *AGP* gena *A. thaliana* je da su široko eksprimirani u najvećem broju organa biljaka, dok drugu polovinu karakteriše ekspresija specifična ili najviše izražena u određenim



organima, uglavnom u polenu, korenovima, listovima i izdancima (Showalter i sar., 2010). Iako su *CeAGP* geni inicijalno detektovani u transkriptomu i lista i korena kičice, tokom morfogeneze *in vitro* je detektovana povećana ekspresija ovih gena i različiti obrasci ekspresije (**Slika 44**; **Tabela 18**). Na osnovu tih podataka moguće je proceniti potencijalne uloge ispitivanih gena u različitim morfo-genetskim procesima. U literaturi je malo podataka koji se odnose na ispitivanje promena ekspresije *AGP* gena tokom procesa SE i organogeneze. Povećana ekspresija *AtFLA1* i *AtFLA2* transkripata je ukazala na uloge FLA u formiranju kalusa i meristema pupoljaka i korenova, odnosno u procesu sticanja kompetencije i indukcije pupoljaka kod *A. thaliana* (Johnson i sar., 2003). Imin i saradnici (2008) su detektovali najmanje dva puta povećanu ekspresiju *FLA* gena u embriogenim kulturama mutantne linije 2HA *M. truncatula* u odnosu na divlji tip Jemalong, ali uloga AGP u indukciji SE kod ove vrste još nije razjašnjena.

Izražena ekspresija detektovana je kod *CeAGP1* i *CeAGP3* gena u odnosu na ostale gene, ali su se obrasci ekspresije razlikovali (**Tabela 18**). Statistički značajno povećanje broja *CeAGP1* transkripata detektovano je desetog dana samo na hranljivim podlogama sa regulatorima rasteња, na kojima su indukovani procesi indirektnе SE i organogeneze, i dalje zadržava visoke vrednosti sve do 20. dana (**Slika 44**; **Tabela 18**). Ovakav obrazac ekspresije bi mogao ukazivati na ulogu *CeAGP1* u procesu formiranja kalusa i somatskih embriona, jer do obrazovanja kalusa duž povređenih ivica listova dolazi tokom druge nedelje gajenja na BM5 i BM6 hranljivim podlogama. Anatomskim istraživanjima smo pokazali da nakon 7 dana dolazi do diferencijacije meristemskih centara u subepidermalnom sloju lista (**Slika 16b**), a već 14. dana uočavaju se proembriogene mase i globularni somatski embrioni (**Slika 16c, d**). Poređenjem sekvenci *CeAGP1* sa FLA drugih biljaka uočena je homologija sa sekvencama *AtFLA11* *A. thaliana*, *PopFLA 11* *P. tremula x P. alba*, *GhAGP2* *G. hirsutum* i *EniFLA3* *E. nitens*, koji imaju pretpostavljene uloge u rasteњу i diferenciranju ćelijskog zida tokom diferenciranja ksilema i izduživanja trihoma (**Slika 34**). *PopFLA11* *P. tremula x P. alba* je specifično eksprimiran u ksilemu, sa izraženo povećanom ekspresijom tokom diferenciranja ksilema i mogućom specifičnom ulogom tokom diferenciranja ćelijskog zida (Lafarquette i sar., 2004). Ekspresija *EniFLA3* je specifična za ksilem tokom njegovog diferenciranja kod *E. nitens* (Macmillan i sar., 2010). Uloga FLA u formiranju ćelijskih zidova je potvrđena i kod *A. thaliana*, jer je ekspresija

*AtFLA11* i *AtFLA12*, sa kojima *CeAGPI* kičice takođe pokazuje veliku sličnost u strukturi, usko povezana sa biosintezom ćelijskog zida (Macmillan i sar., 2010). Liu i saradnici (2008) sugerišu, na osnovu povišenog nivoa transkripcije tokom izduživanja trihoma koji prekrivaju seme *G. hirsutum*, da bi *GhAGP2* mogao predstavljati signalni molekul u komunikaciji ćelija tokom izduživanja trihoma i razmekšavanju ćelijskog zida tokom ekspanzije ćelija vlakana. Subćelijska lokalizacija ovog proteina na spoljašnjoj strani ćelijske membrane pomoću GPI-sidra, omogućila bi interakciju ugljeno-hidratne komponente sa proteinima ćelijskog zida koji imaju ulogu u razmekšavanju ćelijskog zida, kao što su ekspanzini i ksiloglukan transglikozilaza, a sa druge strane je moguća interakcija sa komponentama citoskeleta, uključujući mikrotubule i aktinske filamente, tokom izduživanja vlakana (Liu i sar., 2008). Iako su ovi autori pokazali da je ekspresija ovog gena vezana za rastenje ćelija, takođe su pokazali da nema ekspresije u neembriogenom kalusu, embriogenom kalusu i somatskim embrionima, na osnovu čega su zaključili da nemaju ulogu u SE kod pamuka. Faik i saradnici (2006) pretpostavljaju da je istovremeno prisustvo fasciklin domena i GPI-sidra u molekulu FLA značajno za signalnu i adhezivnu ulogu ovih molekula u komunikaciji između ćelija i njihovog okruženja, uspostavljanjem fizičkog kontakta sa susednim ćelijama ili sa njihovim ECM, koji može biti centralni deo signalne transdukcije kojom ćelije primaju informacije iz neposrednog okruženja. Fizičke interakcije se mogu ostvarivati putem fasciklin domena, koji predstavljaju adhezivne domene, ali nije poznato pomoću kojih mehanizama ovi domeni posreduju u ovim interakcijama (Faik i sar., 2006). Pretpostavka je da nekovalentne interakcije između FAS domena različitih FLA imaju ulogu u ograničavanju ekspanzije ćelija (Clout i sar., 2003).

Johnson i saradnici (2003) predlažu da se regulacija uloge FLA može odigravati putem jednog od tri mehanizama: a) putem *de novo* sinteze odgovarajućih FLA; b) putem modifikacija ugljenohidratne komponente i promenom stukture FLA (van Hengel i sar., 2001; van Hengel i sar., 2002); c) oslobađanjem FLA sa ćelijske membrane odvajanjem od GPI sidra pomoću fosfolipaze C (Schultz i sar., 1998). Delovanjem fosfolipaza na AGP koji su vezani za ćelijsku membranu dolazi do oslobađanja glikoproteina kao signalnog molekula u ECM. Delovanjem specifičnih enzima na ugljenohidratnu komponentu AGP mogu biti generisani oligosaharidi kao potencijalni

signalni molekuli (Smertenko i Bozhkov, 2014). Van Hengel i saradnici (2002) smatraju da ćelije iz embriogenih suspenzija proizvode AGP sa GlcNAc u svojim ugljenuhidratnim lancima, ali to nije slučaj sa ćelijama iz neembriogenih suspenzija. U prisustvu AGP koji sadrže *N*-vezane glikane dolazi do povećanja embriogenog potencijala somatskih ćelija u kulturi, tako što delovanjem hitinaza na AGP molekule koji sadrže GlcNAc, monomer hitina, dolazi do oslobađanja oligosaharida koji se ponašaju kao signalni molekuli koji stimulišu SE (van Hengel i sar., 2001; van Hengel i sar., 2002). Johnson i saradnici (2003) smatraju da bi upravo FLA mogli biti bioaktivni AGP odgovorni za funkciju u SE, jer je njihova karakteristika *N*-glikozilacija koja se odvija na 2-8 mesta najčešće u okviru FAS domena, dodavanjem glikana na azot bočnih lanaca asparagina. Stimulativan efekat na formiranje somatskih embriona imaju i lipohitooligosaharidi ili Nod faktori *Rhizobium*-a kod temperaturno osetljive mutantne ćelijske linije *D. carota* ts11 (De Jong i sar., 1993) i *P. abies* (Dyachok i sar., 2002). Nod faktori spadaju u glukozaminske oligosaharide i predstavljaju modifikovane lance *N*-acilovanog hito-oligosaharida. Postoji pretpostavka da bi endohitinaze mogle biti uključene u nastanak sličnih jedinjenja kod viših biljaka koja imaju morfogenetsko dejstvo u SE (De Jong i sar., 1993).

S obzirom na to da domeni predstavljaju funkcionalne jedinice proteina, pretpostavljamo da je domen bogat Lys takođe od značaja za funkciju CeAGP1. Međutim njegova uloga u molekularnim interakcijama još uvek nije poznata (Sun i sar., 2005). Gao i Showalter (2000) su pokazali da je ekspresija LeAGP1 *L. esculentum* razvojno regulisana, sa ulogom u debljanju sekundarnog ćelijskog zida ksilemskih elemenata korenova i izdanaka. Ekspresija klasičnih AGP bogatih Lys *A. thaliana* je specifična za organe, AtAGP17 je eksprimiran u listovima i izdancima, dok su AtAGP18 i AtAGP19 eksprimirani u cvetovima, i u manjem stepenu u mladim listovima, korenovima i izdancima (Sun i sar., 2005).

Na osnovu poređenja strukture i funkcije ortologih proteina različitih biljnih vrsta, kao i na osnovu specifičnog obrasca ekspresije *CeAGP1* predlažemo ulogu adhezivnog i signalnog molekula u ćelijskim deobama tokom kalusogeneze i formiranja somatskog embriona. Povećana ekspresija *CeAGP1* tokom formiranja kalusa i ranih razvojnih stadijuma somatskih embriona, proembriogene mase i globularnih somatskih embriona, ukazuju na njegovu moguću važnu ulogu u procesu SE i mogao bi

predstavljati potencijalni marker SE. S obzirom na to da je do povećanja ekspresije došlo i na BM5 podlozi na svetlosti gde je indukovana istovremena pojava procesa SE i indirektna organogeneza pupoljaka, potrebna su dalja ispitivanja radi utvrđivanja uloge *CeAGP1* u procesu ISE. U literaturi ima malo podataka koji potvrđuju značaj pojedinačnih AGP u procesu SE. Poon i saradnici (2012) su iz AGP frakcije koja se nalazi u hranljivoj podlozi na kojoj je gajen embriogeni kalus *G. hirsutum*, izolovali ekstracelularni AGP protein GhPLA1 i dokazali da je proteinski deo ovog AGP molekula odgovoran za stimulisanje SE. Naime, nakon dearabinozilacije i kompletne deglikozilacije ovaj AGP je i dalje zadržavao svoju funkciju. GhPLA1 je himerni protein od 175 aminokiselina koji osim sekrecionog signala na N-terminusu, AGP domena i hidrofobnog domena na C-terminusu sadrži i eNOD ili PL - fitocijanin domen, pa spada u grupu eNOD-AGP. Smatra se da je upravo fitocijanin domen odgovoran za stimulisanje procesa SE. Na ovaj način je identifikovan pojedinačni AGP koji je uključen u regulaciju SE, ali mehanizmi pomoću kojih se ostvaruje ova regulacija još uvek nisu otkriveni (Poon i sar., 2012).

Ekspresija *CeAGP3* gena je statistički značajno povećana na BM hranljivoj podlozi, 20. dana u mraku i na podlogama sa regulatorima rasteenja, BM5 i BM6, 10. dana, na osnovu toga možemo pretpostaviti da ima ulogu u svim morfogogenetskim procesima, direktnim i indirektnim (**Slika 44**, **Tabela 18**). S obzirom na pretpostavljeno prisustvo GPI-sekvence, verovatno je da ovaj AG peptid može predstavljati signalni molekul u morfogenezi. Jedan od mehanizama putem kojih bi AGP sa GPI sidrom mogli biti uključeni u signalnu transdukciju je oslobađanje AGP sa ćelijske membrane delovanjem fosfolipaza (Schultz i sar., 1998). S obzirom na to da DUF1070 domen obuhvata deo AGP domena i kompletnu GPI-signalnu sekvencu, moguće je da se odsecanjem GPI-signalne sekvence sa konzervisanom primarnom strukturom formiraju intracelularni signali. Proteinski deo zrelog AG peptida od 13 aminokiselina, vezan za membranu pomoću GPI sidra, takođe može predstavljati signalni molekul. Pretpostavljena mala molekulska masa (**Tabela 17**), omogućava da lako može difundovati kroz ćelijske zidove susednih ćelija. Schultz i saradnici (2000) predlažu da AG peptidi *A. thaliana* sa molekulskom masom 20 kD mogu difundovati kroz pore ćelijskog zida veličine 40 kD.

Na BM5 hranljivoj podlozi dolazi do pada ekspresije *CeAGP1*, *CeAGP2*, *CeAGP3* i *CeAGP4* gena nakon 15 dana, koje je naročito izraženo kod *CeAGP4* gena. Možemo pretpostaviti da bi se ovaj pad ekspresije mogao dovesti u vezu sa procesom indirektno organogeneze adventivnih pupoljaka koji se odvijao na BM5 podlozi (**Slika 17a, b**).

Iako *CeAGP4* ima sličan obrazac ekspresije kao *CeAGP1* gen, povećanje ekspresije detektovano na BM5 i BM6 hranljivim podlogama je slabo izraženo, jer je visoka ekspresija detektovana i u kontrolnim eksplantatima, tako da su vrednosti relativne ekspresije niske (**Slika 44**). Ekspresija *CeAGP4* gena navodi na zaključak da ovaj gen ima određenu ulogu u procesu kalusogeneze i SE iz odsečaka listova kičice. Ovaj AGP takođe ima jedan FAS domen i najverovatnije dva AGP domena, kao i *CeAGP1*, ali smo poređenjem pokazali da homologiju pokazuje sa *TaFLA5* *T. aestivum* (Faik i sar., 2006) i *GhFLA12* *G. hirsutum* (Huang sar. 2008). Ekspresija *TaFLA5* i *GhFLA12* je tkivno specifična ili je veoma visoka u određenim tkivima. Ekspresija *FLA5* je specifična za endosperm pšenice (Faik i sar., 2006), dok ekspresija *FLA12* nije tkivno specifična, ali je visoka u listovima, hipokotilima i ovulama pamuka (Huang sar. 2008). Za razliku od prethodna dva *FLA* gena, predviđeno je da *CeAGP2* ima dva fasciklin domena i odsustvo GPI-signalne sekvence, i pokazuje veliku sličnost sa ortologim proteinima iz pšenice, *FLA 26* (Faik i sar., 2006) i pamuka, *FLA15* (Huang i sar., 2008). *FLA 26* je eksprimiran u semenima, korenovima i listovima, a *FLA15* je eksprimiran tokom diferencijacije trihoma pamuka, u korenovima i hipokotilima. *CeAGP2* ima različit obrazac ekspresije u odnosu na druga *FLA* gena kičice, jer je eksprimiran na svim hranljivim podlogama i u kontroli, mada je povećanje ekspresije statistički značajno samo na BM5 i BM6. Odsustvo GPI-signalne sekvence kod *CeAGP2* ukazuje na to da se radi o proteinu koji se luči u ECM i nije vezan za plazma membranu.

U slučaju *CeAGP5* gena uočava se drugačiji obrazac ekspresije i relativno povećanje je najmanje u odnosu na kontrolu među ispitivanim genima. Tokom prvih sedam dana dolazi do statistički značajnog smanjenja ekspresije na svim podlogama (**Slika 44, Tabela 18**). Visok nivo ekspresije zabeležen u kontrolnim eksplantatima može ukazivati na njegovu ulogu u osnovnim ćelijskim procesima. Pretpostavljeno je postojanje kompleksnog PH-GRAM\_WBP2 domena u strukturi *CeAGP5* čija funkcija

prema našim saznanjima nije opisana kod biljaka. Opisane su funkcije pojedinih domena, npr. GRAM domena u intracelularnom vezivanju proteina ili lipida, koje ima važnu ulogu u procesima asociranim za membranu, dok PH domen ima ulogu u vezivanju fosfatidilinozitol lipida i ciljanom prenosu proteina ka membrani. S obzirom na vezujuće domene koje sadrži, kao i odsustvo N-signalne sekvence, možemo pretpostaviti da CeAGP5 predstavlja intracelularni protein, sa mogućom ulogom u transdukciji signala ili u procesima asociranim za membranu.

Dok u literaturi postoji mnogo podataka koji se odnose na efekat  $\beta$ GlcY na različite razvojne procese i sadržaj AGP u tkivima, podataka o njegovom uticaju na ekspresiju *AGP* gena je malo. Ekspresija svih *CeAGP* gena je bila indukovana kod uzoraka koji su gajeni na BM5Y75 hranljivoj podlozi na svetlosti (**Slika 44**). Tretman  $\beta$ GlcY nije uticao na sadržaj ukupnih AGP u odsečcima listova tokom indukcije morfogeneze (**Slika 29**), tako da možemo pretpostaviti da je povećana ekspresija ispitanih, a možda i drugih AGP gena, doprinela održavanju nivoa AGP u eksplantatima (**Tabela 18**). Snažno povećanje ekspresije pod dejstvom  $\beta$ GlcY je detektovano kod *CeAGP1* i *CeAGP3* gena (**Tabela 18**), kojima bi mogla biti pripisana uloga u morfogenetskim procesima kod kičice na osnovu njihovih obrazaca ekspresije. Slične rezultate dobili su Guan i Nothangel (2004), koji su pratili efekat 50  $\mu$ M  $\beta$ GlcY na ćelijsku suspenziju *A. thaliana* i detektovali povećanu ekspresiju najmanje 9 *AGP* gena već nakon jednog sata. Takođe su primetili da je među indukovanim genima najviše onih s ulogama u modifikacijama i sintezi ćelijskog zida. Nejasno je da li ovu indukciju ekspresije izaziva umrežavanje  $\beta$ -GlcY sa AGP ćelijskog zida, putem AGP signalnog mehanizma ili putem opšteg narušavanja ćelijske površine usled agregacije kompleksa  $\beta$ GlcY-AGP. Lucau-Danila i saradnici (2010) navode suprotne rezultate, jer tokom SE ciklorije uočavaju smanjenu ekspresiju *AGP* gena pod dejstvom  $\beta$ GlcY.

Primenom različitih metoda dobili smo prve rezultate o potencijalnoj ulozi AGP u procesu *in vitro* morfogeneze kičice iz odsečaka listova kičice. Radikalnom difuzijom i ukrštenom elektroforezom odredili smo količinu i kvalitativne osobine AGP u tkivima kičice. Primenom imunohistohemijske metode lokalizovali smo specifične AGP epitope u ćelijskom zidu i pokazali njihovu razvojnu regulaciju tokom SE. Identifikacijom i sekvenciranjem 4 *CeAGP* gena i praćenjem njihove ekspresije tokom *in vitro*

morfogeneze kičice uočili smo povećanje ekspresije ovih gena, što ukazuje na njihove moguće uloge.

## 6. ZAKLJUČCI

Osnovni zaključci istraživanja izvedenih u okviru ovog rada su:

1. Variranjem koncentracija i odnosa regulatora rastenja, 2,4-D i CPPU, u hranljivoj podlozi, kao i svetlosnog režima, dobijena je *in vitro* morfogeneza iz lisnih odsečaka kičice (*Centaureum erythraea* Rafn.) i to putem četiri različita morfogogenetska procesa: direktne organogeneze pupoljaka, indirektna organogeneza pupoljaka, direktne rizogeneze i indirektna somatske embriogeneze.
2. Somatski embrioni, koji se formiraju putem indirektna SE, vode poreklo od ćelija subepidermalnog sloja, a pupoljci, koji se formiraju putem indirektna organogeneze, od ćelija mezofila i subepidermalnog sloja odsečaka listova. Proces SE je asinhron, a na svetlosti i u prisustvu regulatora rastenja se odvija istovremeno sa procesom indirektna organogeneze pupoljaka.
3. SOD i CAT su uključene u antioksidativnu zaštitu listova kičice od oštećenja izazvanih povredom, dok POX imaju dominantnu ulogu tokom svih morfogogenetskih procesa koji su se odvijali na odsečcima listova kičice.
4. Morfogogenetski procesi koji se dešavaju na odsečcima listova kičice *in vitro* razlikuju se po osetljivosti na prisustvo  $\beta$ -D-glukozil Yariv reagensa u hranljivim podlogama te se po rastućoj osetljivosti mogu poredati kao: direktna rizogeneza (neosetljiva) < indirektna organogeneza pupoljaka < direktna organogeneza pupoljaka << indirektna SE (veoma osetljiva).
5. Različiti morfogogenetski procesi koji su se odvijali na odsečcima listova kičice su praćeni sintezom različitih setova AGP. Ekspresija nekoliko specifičnih AGP epitopa je razvojno regulisana tokom SE kičice.



6. Pretraživanjem transkriptoma BLAST analizom je bilo moguće identifikovati samo AGP sekvence koje imaju konzervisane domene, kao što su FAS (kod *CeAGP1*, *CeAGP2* i *CeAGP4*) i DUF1070 (kod *CeAGP3*).
7. Analiza ekspresije *CeAGP* gena tokom procesa *in vitro* morfogeneze kod kičice ukazuje na to da *CeAGP1* verovatno ima važnu i specifičnu ulogu u indirektnoj somatskoj embriogenezi, dok *CeAGP3* učestvuje u svim morfogenetskim procesima koji su se odvijali na odsečcima listova.

## 7. LITERATURA

1. Acosta-Garcia G., Vielle-Calzada J.-P. (2004): A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2614-2628.
2. Adams L. K., Benson E. E., Strains H. J., Bremner D. H., Millam S., Deighton N. (1999). Effects of the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and malondialdehyde on the proliferation and morphogenetic development of *in vitro* plant cells. *Journal of Plant Physiology* 155: 376-386.
3. Aebi H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121 – 126.
4. Alcher R. G., Erturk N., Heath L. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
5. Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
6. Asensio A. C., Marino D., James E. K., Ariz I., Aresse-Igor C., Aparicio-Tejo P. M., Arredondo-Peter R., Moran J. F. (2011): Expression and localization of a rhizobium-derived cambialistic superoxide dismutase in pea (*Pisum sativum*) nodules subjected to oxidative stress. *Molecular Plant Microbe Interactions* Vol. 24, 10: 1247-1257.
7. Bach A., Pawlowska B. (2003): Somatic embryogenesis in *Gentiana pneumonanthe*. *Acta Biologica Cracoviensia Botanica* 45: 79-86.
8. Banjanac T., Šiler B., Skorić M., Ghalawenji N., Milutinović M., Božić D., Mišić D. (2014): Interspecific *in vitro* hybridization in genus *Centaurium* and identification of hybrids via flow cytometry, RAPD, and secondary metabolite profiles. *Turkish Journal of Botany* 38(1): 68-79.
9. Baque M. A., Hahn E. - J., Paek K. – Y. (2010): Growth, secondary metabolite production and antioxidant enzyme response of *Morinda citrifolia* adventitious root as affected by auxin and cytokinin. *Plant Biotechnology Report* 4: 109-116.
10. Barešová H. (1988): *Centaurium erythraea* Rafn: Micropropagation and the production of secoiridoid glucosides. In: Bajaj YPS (ed.) *Biotechnology in*

Agriculture and Forestry 4, Medicinal and Aromatic Plants I. Springer, New York, pp. 350-366.

11. Barešová H., Herben T., Kamínek M., Krekule J. (1985): Hormonal control of morphogenesis in leaf segments of *Centaureum erythraea*. *Biologia Plantarum* 27: 286-291.
12. Barešová H., Kamínek M. (1984): Light induce embryogenesis in suspension culture of *Centaureum erythraea* Rafn. In: Plant tissue and cell culture propagation to crop improvement. Novák F. J., Havel L. and Doležal J. (eds.) Czech Academy of Sciences, Prague, pp. 163-164.
13. Bastiani M. J., Harrelson A. L., Snow P. M., Goodman C. S. (1987): Expression of fasciclin I and II glycoproteins on subsets of axon pathways during neuronal development in the grasshopper. *Cell* 48: 745-755.
14. Beauchamp C., Fridovich I. (1971): Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.
15. Beerhues L., Berger U. (1994): Xanthenes in cell suspension cultures of two *Centaureum* species. *Phytochemistry* 35(5): 1227-1231.
16. Ben Amar, A., Cobanov P., Ghorbel A., Mliki A., G. M. Reustle G. M. (2010): Involvement of arabinogalactan proteins in the control of cell proliferation of *Cucurbita pepo* suspension cultures. *Biologia Plantarum* 54 (2): 321–324.
17. Benson E. E. (2000). Special Symposium: In vitro plant recalcitrance do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 36: 163-170.
18. Bertram L., Lercari B. (2000): Phytochrome A and Phytocrome B control the aquisition of competence for shoot regeneration in tomato hypocotil. *Plant Cell Reports* 19: 604-609.
19. Beyer W.F., Fridovich I. (1987): Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* 161(2): 559 – 566.
20. Bhojwani S.S., Dantu P.K. (2013): Conservation of Phytodiversity. In: *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer, India. pp. 287-298.
21. Blazquez S., Olmos E., Hernandez J. A., Fernandez- Garcia N., Fernandez J. A., Piqueras A. (2009): Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.).

- Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 97: 49-57.
22. Blomberg N., Baraldi E., Nilges M., Saraste M. (1999): The PH superfold: a structural scaffold for multiple functions. *Trends in Biochemical Sciences* 24: 441-445.
  23. Borderies G., le Behec M., Rossignol M., Laffitte C., Le Deunff E., Beckert M., Dumas C., Matthys-Rochon E. (2004): Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *European Journal of Cell Biology* 83: 202-212.
  24. Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M., Inze D. (1994). Superoxide dismutases in plants. *Critical reviews in Plant Science* 13, 199-218.
  25. Bradford M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 24 – 54.
  26. Bradley D. J., Wood E. A., Larkins A. P., Galfre G., Butcher G. W., Brewin N. J. (1988): Isolation of monoclonal antibodies reacting with peribacteroid membranes and other components of pea root nodules containing *Rhizobium leguminosum*. *Planta* 173: 149-160.
  27. Brownlee K. (2002): Role of the extracellular matrix in cell-cell signalling: paracrine paradigms. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 396-401.
  28. Çaliskan M., Turet M., Cuming A. C. (2004): Formation of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryogenic callus involves peroxide-generating germin-like oxalate oxidase. *Planta* 219: 132-140.
  29. Cantelmo L., Soares B. O. Rocha L. P., Pettinelli J. A., Callado C. H., Mansur E., Casteller A., Gagliardi R. F. (2013): Repetitive somatic embryogenesis from leaves of the medicinal plant *Petiveria alliacea* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 115: 385-393.
  30. Capataz-Tafur J., Trejo-Tapia G., Rodriguez-Monroy M., Sepulveda-Jimenez G. (2011): Arabinogalactan-proteins are involved in cell aggregation of cell suspension cultures of *Beta vulgaris* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 106: 169-177.

31. Carpita N. C., Gibeaut D. M. (1993): Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal* 3:1-30.
32. Cassels A. C., Curry R. F. (2001): Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 64: 145-157.
33. Chapman A., Blervacq A. S., Vasseur J., Hilbert J. L. (2000): Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of beta-glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta* 211: 305-314.
34. Chaudhuri R. K., Amita P., Jha B. T. (2008): Conversation of *Swertia chirata* through direct shoot multiplication from leaf explants. *Plant Biotechnology Report* 2: 213-218.
35. Chaves I, Regalado AP, Chen M, Ricardo CP, Showalter AM (2002): Programmed cell death induced by ( $\beta$ -D-galactosyl)<sub>3</sub> Yariv reagent in *Nicotiana tabacum*, BY-2 suspension-cultured cells. *Physiologia Plantarum* 116: 548-553.
36. Chen J.-T., Chung W.-C. (2001): Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium* „Gower Ramsey“. *Plant Growth Regulation* 34: 229-232.
37. Chen C.G., Pu Z.Y., Moritz R.L., Simpson R.J., Bacic A, Clarke A.E., Mau S.L. (1994): Molecular cloning of a gene encoding an arabinogalactan-protein from pear (*Pyrus communis*) cell suspension culture. *Proceedings of National Academy of Science USA* 91:10305-10309.
38. Chung H. H., Chen J. T., Chang W. C. (2007): Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. *Biologia Plantarum* 51: 346-350.
39. Coimbra S., Costa M., Jones B., Mendes M. A., Pereira L. G. (2009): Polen grain development is comprised in *Arabidopsis* agp6 agp11 null mutants. *Journal of Experimental Botany* 60:3133-3142.

40. Cosio C., Dunand C. (2009): Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany* 60:391-408.
41. Christensen B., Sriskandarajah S., Serek M., Muller. (2008): Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* with rol genes useful in molecular breeding towards compact growth. *Plant Cell Report* 27: 1485-1495.
42. Čellárová E., Repčáková K., Repčák M., Hončariv R. (1983): Morphogenesis in tissue cultures of some medicinal plants. *Acta Horticulturae (ISHS)* 132: 249-256.
43. Dahiya P., Findlay K., Roberts K., McCann M. (2006): A fasciclin –domain containing gene, *ZeFLA11*, is expressed exclusively in xylem elements that have reticulate wall thickenings in the stem vascular system of *Zinnia elegans* cv Envy. *Planta* 223: 1281-1291.
44. Dat J., Vandenabeele J., Vranova E., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F. (2000): Dual action of active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 779-795.
45. De Jong A. J., Cordewener J., Lo Schiavo F., Terzi M., Vandekerckhove J, van Kammen A., de Vries S. C. (1992): A carrot somatic embryos mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 4:425-433.
46. Demesa-Arevalo E., Vielle-Calzada J.-P. (2013): The classical arabinogalactan protein AGP18 mediates megaspore selection in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25: 1274-1287.
47. De Marco A., Roubelakis-Angelakis A. K. (1996): Hydrogen peroxide plays a bivalent role in the regeneration of protoplasts. *Journal of Plant Physiology* 149: 109-114.
48. Ding L., Zhu J. K. (1997): A role for arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion. *Planta* 203: 289-294.
49. Doerks T., Strauss M., Brendel M., Bork P. (2000): GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 483-485.

50. Du H., Clarke A. E., Bacic A. (1996): Arabinogalactan proteins: a class of extracellular matrix proteoglycans involved in plant growth and development. *Trends in Cell Biology*. 6: 411-414.
51. Du H., Simpson R. J., Moritz R. L., Clarke A. E., Bacic A. (1994): Isolation of the protein backbone of an arabinogalactan-protein from the styles of *Nicotiana glauca* and characterization of a corresponding cDNA. *Plant Cell* 6: 1643-1653.
52. Egertsdotter U., von Arnold S. (1995): Importance of arabinogalactan-proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia Plantarum* 93: 334-345.
53. Eisenhaber B., Bork P., Eisenhaber F. (1998): Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Engineering* 11: 1155-1161.
54. Eisenhaber B., Wildpaner M., Schultz C. J., Borner G. H. H., Dupree P., Eisenhaber F. (2003): Glycosylphosphatidylinositol lipid anchoring of plant proteins. Sensitive prediction from sequence- and genome-wide studies for Arabidopsis and rice. *Plant Physiology* 133: 1691-1701.
55. Ellis M., Egelund J., Schultz C. J., Bacic A. (2010): Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface. *Plant Physiology* 153: 403-419.
56. Elkins T., Hortsch M., Bieber A. J., Snow P. M., Goodman C. S. (1990): *Drosophila* fasciclin I is a novel homophilic adhesion molecule that along with fasciclin III can mediate cell sorting. *The Journal of Cell Biology* 110: 1825-1832.
57. Endo M., Kotake T., Watanabe Y., Kimura K., Tsumuraya Y. (2013): Biosynthesis of the carbohydrate moieties of arabinogalactan proteins by membrane-bound  $\beta$ -glucuronosyltransferases from radish primary roots. *Planta* 238: 1157-1169.
58. Etzler M. E. (1998): Oligosaccharide signaling of plant cells. *Journal of Cellular Biochemistry-Supplements* 30-31: 123-128.
59. European Pharmacopoeia (2010): Centaurii herba, 7<sup>th</sup> ed. DEQS, Strasbourg, Main Vol 7, pp. 1095-1096.

60. Faik A., Abouzouhair J., Sarhan F. (2006): Putative fasciclin-like arabinogalactan-proteins in wheat (*Triticum aestivum*) and rice (*Oryza sativa*): identification and bioinformatic analyses. *Molecular Genetics and Genomics*, 276: 478-494.
61. Feher A. (2015): Somatic embryogenesis – stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta* 1849 (4): 385-402.
62. Feher A., Pasternak T.P., Dudits D. (2003): Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 74, 201-228.
63. Fergusson C., Bacic A., Anderson M. A., Read S. M. (1999): Subcellular distribution of arabinogalactan proteins in pollen grains and tubes as revealed with a monoclonal antibody raised against stylar arabinogalactan proteins. *Protoplasma* 206: 105-117.
64. Filonova L. H., Bozhkov P. V., Von Arnold S. (2000): Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany* 51: 249-264.
65. Fincher G.B., Sawyer W.H., Stone B.A. (1974): Chemical and physical properties of an arabinogalactan-peptide from wheat endosperm. *Biochemical Journal* 139: 535-545.
66. Fiore S., Pasquale D. F., Carimi F., Sajeve M. (2002): Effect of 2,4D and 4-CPMU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin layers of *Citrus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68: 57-63.
67. Fiuk A., Rybczynski J. J. (2008b): Genotype and plant growth regulator-dependent response of somatic embryogenesis from *Gentiana* spp. leaf explants. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 44:90-99.
68. Fiuk A., Rybczynski J. J. (2008a): Morphogenic capability of *Gentiana kuroo* Royle seedling and leaf explants. *Acta Physiologiae Plantarum* 30:157-166.
69. Fragkostefanakis S., Dandachi F., Kalaitzis P. (2012): Expression of arabinogalactan proteins during tomato fruit ripening and in response to mechanical wounding, hypoxia and anoxia. *Plant Physiology and Biochemistry* 52: 112-118.



70. Francois J., Lallemand M., Fleurat-Lessard P., Laquitaine L., Delrot S., Coutos –Thevenot P., Ghomes E. (2008): Overexpression of the VvLTP1 gene interferes with somatic embryo development in grapevine. *Functional Plant Biology* 35: 394-402.
71. Gaj D. M. (2004): Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43: 27-47.
72. Gao M., Showalter A. M. (1999): Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. *The Plant Journal* 19 (3):321-331.
73. Gao M., Showalter A. M. (2000): Immunolocalization of LeAGP1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato. *Planta* 210: 865-874.
74. Gaspar Y. M., Johnson K.L., McKenna J.A., Bacic A., Schultz C.J. (2001): The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology* 47: 161-176.
75. Gaspar Y., Nam J., Schultz C.J., Lee L.-Y., Gilson P. R., Gelvin S. B., Bacic A. (2004): Characterization of the *Arabidopsis* lysine-rich arabinogalactan protein AtAGP17 mutant (*rat1*) that results in a decreased efficiency of *Agrobacterium* transformation. *Plant Physiology* 135: 2162-2171.
76. Gell C. A., Bacic A., Clarke A. E. (1986): Arabinogalactan-proteins of the female sexual tissue of *Nicotiana glauca*. Changes during flower development and pollination. *Plant Physiology* 82: 885-889.
77. Ghanti S. K., Sujata K. G., Rao S., Udayakumar M., Kavi Kishor P. B. (2009): Role of enzymes and identification of stage-specific proteins in developing somatic embryos of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 45: 667-672.
78. Gill S. S., Tuteja N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

79. Göllner M. E., Ichinose H., Kaneko S., Blaschek W., Classen B. (2011): An arabinogalactan-protein from whole grain of *Avena sativa* L. belongs to the wattle-blossom type of arabinogalactan-proteins. *Journal of Cereal Science* 53: 244-249.
80. Goodacre N. F., Gerloff D. L., Uetz P. (2013): Protein domains of unknown function are essential in bacteria. <http://mbio.asm.org/content/5/1/e00744-13.full>
81. Grafi G., Barak S. (2014): Stress induces dedifferentiation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.015>.
82. Guan Y., Nothangel E. A. (2004): Binding of arabinogalactan proteins by yariv phenylglycoside triggers wound-like responses in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiology* 135: 1346-1366.
83. Guan L., Scandalios J. G. (2000): Hydrogen peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding. *Free Radical Biology and Medicine* 28: 1182-1190.
84. Gutiérrez-Mora A., González-Gutiérrez A. G., Rodríguez-Garay B., Ascencio-Cabral A., Li-Wei L. (2012): Plant Somatic Embryogenesis: Some useful considerations. *Embryogenesis*, Dr. Ken-Ichi Sato (Ed.), ISBN: 978-953-51-0466-7, InTech. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/35568.pdf>
85. Hahne G., Mayer J. E., Lörz H. (1988): Embryogenic and callus-specific proteins in somatic embryogenesis of the grass *Dactylis glomerata* L. *Plant Science* 55: 267-279.
86. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
87. Hilbert J., Dubois T., Vasseur J. (1992): Detection of embryogenesis-related proteins during somatic embryo formation in *Cichorium*. *Plant Physiology and Biochemistry* 30: 733-741.
88. Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology* 42, 462-468.

89. Hu Y., Qin Y., Zhao J. (2006): Localization of arabinogalactan protein epitopes and effects of Yariv phenylglycoside during zygotic embryo development of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 229: 21-31.
90. Huang G. O., Xu W. L., Gong S. Y., Li B., Wang X. L., Xu D., Li X. B. (2008): Characterization of 19 novel cotton *FLA* genes and their expression profiling in fiber development and in response to phytohormones and salt stress. *Physiologia Plantarum* 134: 348-359.
91. Huang G. - Q., Gong S. - Y., Xu W. - L., Li W., Li P., Zhang C. - J., Li D. - D., Zheng Y., Li F.- G., Li X.- B. (2013): A fasciclin-like arabinogalactan protein, GhFLA1, is involved in fiber initiation and elongation of cotton. *Plant Physiology* 161: 1278-1290.
92. Imin N., Goffard N., Nizamidin M., Rolfe G. B. (2008): Genome-wide transcriptional analysis of super-embryonic *Medicago truncatula* explants cultures. *BMC plant Biology* 8 (110): 1-14.
93. Jain S. M., Brar D. S., Ahloowalia B. S. (1998): Somaclonal variations and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
94. Janković T., Krstić D., Šavikin-Fodulović K., Menković N., Grubišić D. (2002): Xanthones and secoiridoids from hairy root cultures of *Centaureum erythraea* and *C. pulchellum*. *Planta Medica* 68(10): 944-946.
95. Jensen W. A. (1962): Botanical histochemistry. Freeman, San Francisco, USA.
96. Jensen S. R., Schripsema J. (2002): Chemotaxonomy and pharmacology of *Gentianaceae*. In: *Gentianaceae – Systematics and Natural History* (Struwe, L., Albert V., eds.). Cambridge University Press, London, UK, pp: 573-631.
97. Jha B. T., Dafadar A., Chaudhuri R. K. (2011): Somatic embryogenesis in *Swertia chirata* Buch. Ham ex Wall. – A multipotent medicinal herb. *Asian Journal of Biotechnology* 3(2): 186-193.
98. Jiang S. -Y., Ramamoorthy R., Ramachandran S. (2008): Comparative transcriptional profiling and evolutionary analysis of the GRAM domain family in eukaryotes. *Developmental Biology* 314: 418-432.

99. Jimenez V. M. (2001): Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13: 196-223.
100. Jimenez V. M. (2005): Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47: 91-110.
101. Johnson K. L., Jones B. J., Bacic A., Shultz C. J. (2003): The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiology*, 133: 1911-1925.
102. Johnson K. L., Kibbie N. A. J., Bacic A., Shultz C. J. (2011): A fasciclin-like arabinogalactan protein (FLA) mutant of *Arabidopsis thaliana*, *fla1*, shows defects in shoot regeneration. *PLOS ONE* 6(9):e25154. doi:10.1371/journal.pone.0025154. <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0025154&representation=PDF>
103. Jovanović-Dunjić R. (1973): U: Flora SR Srbije, Josifović M. SANU, Beograd, Tom V: 408.
104. Jun L., Xiaoming W. (2012): Genome-wide identification, classification and expression analysis of genes encoding putative fasciclin-like arabinogalactan proteins in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). *Molecular Biology Reports* 39: 10541-10555.
105. Kairong C., Gengsheng X., Xinmin L., Gengmei X., Yafu W. (1999). Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Science* 146: 9-16.
106. Karami O. Saidi A. (2010): The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports* 37: 2493-2507.
107. Kawamoto T., Noshiro M., Shen M., Nakamasu K., Hashimoto K., Kawashim-Ohya Y, Gotoh O., Kato Y. (1998): Structural and phylogenetic analyses of RGD-CAP/βig-h3, a fasciclin-like adhesion protein expressed in chick chondrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1395: 288-292.

- 108.** Kim J.E., Jeong H. W., Nam J. O., Lee B.-H., Choi J. Y., Park R. W., Park J.-Y., Kim I.-S. (2002): Identification of motifs in the fasciclin domains of the transforming growth factor- $\beta$ -induced gene,  *$\beta$ ig-h3* that interact with the  $\alpha\beta 5$  integrin. *Journal of Biological Chemistry* 277: 46159-46165.
- 109.** Kitazawa K., Tryfona T., Yoshimi Y., Hayashi Y., Kawauchi S., Antonov L., Tanaka H., Takahashi T., Kaneko S., Dupree P., Tsumuraya Y., Kotake T. (2013):  $\beta$ -Galactosyl Yariv reagent binds to the  $\beta$ -1,3-galactan of arabinogalactan proteins. *Plant Physiology* 161: 1117-1126.
- 110.** Knox J. P. (1995): Developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. *FASEB Journal* 9: 1004-1012.
- 111.** Knox J. P., Day S., Roberts K. (1989): A set of cell surface glycoproteins forms an early marker of cell position, but not cell type, in the root apical meristem of *Daucus carota* L. *Development* 106: 47-56.
- 112.** Knox J. P. (2008): Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 308-313.
- 113.** Konieczny R., Libik M., Tuleja M., Niewiadomska E., Miszalski Z. (2008): Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 71-79.
- 114.** Konieczny R., Swierczynska J., Czaplicki A. Z., Bohdanowicz J. (2007): Distribution of pectin and arabinogalactan protein epitopes during organogenesis from androgenic callus of wheat. *Plant Cell Reports* 26: 355-363.
- 115.** Kreuger M., Postma E., Brouwer Y., van Holst G. J. (1995): Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* in liquid medium. *Physiologia Plantarum* 94: 605-612.
- 116.** Kreuger M., van Holst G. J. (1993): Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 189: 243-248.
- 117.** Kreuger M., van Holst G. J. (1995): Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 197: 135-141.
- 118.** Kumarasamy Y., Nahar L., Cox P. J., Jaspars M., Sarker S. D. (2003): Bioactivity of secoiridoid glucosides from *Centaureum erythraea*. *Phytomedicine* 10: 344-347.

- 119.** Lafarguette F., Leplé J.-C., Déjardin A., Laurans F., Costa G., Lessage – Descauses M. C., Pilate G. (2004): Poplar genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are highly expressed in tension wood. *New Phytologist* 164: 107-121.
- 120.** Lambe P., Mutambel H. S. N., Fouche J.-G., Deltour R., Foidart J.M., Gaspar T. (1997): DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression? *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 33: 155-162.
- 121.** Lamport D.T., Kieliszewski M. J., Showalter A. M. (2006): Salt stress upregulates periplasmic arabinogalactan proteins: using salt stress to analyse AGP function. *New Phytologist* 169: 479-492.
- 122.** Lamport D., Northcote D. (1960): Hydroxyproline in primary cell walls of higher plants. *Nature* 188:665-666.
- 123.** Laureová D., Čellárová E., Hončariv R. (1986): Tolerance of plant tissue of *Centaureum erythraea* to increased concentrations of ions present in soils Eastern Slovakian lowlands. In: Repčák M. (ed.) *Dni rastlinnej fyziológie IV*. Slovenska botaničká spoločnosť pri Sav., pp. 221-222.
- 124.** Lee K. J. D., Sakata Y., Mau S. L., Pettolino F., Bacic A., Quatrano R. S., Knight C. D., Knox J. P. (2005): Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 17: 3051-3065.
- 125.** Lee C. B., Swatek K. N., McClure B. (2008): Pollen proteins bind to the C-terminal domain of *Nicotiana alata* pistil arabinogalactan proteins. *Journal of Biological Chemistry* 283: 26965-26973.
- 126.** Lerouge P., Cabanes-Macheteau M., Rayon C., Fischette-Laine A. C., Gomord V, Faye L (1998): N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Molecular Biology* 38: 31-48.
- 127.** Li Y., Liu D., Tu L., Zhang X., Wang L., Zhu L., Tan J., Deng F. (2010a): Suppression of *GhAGP4* gene expression repressed the initiation and elongation of cotton fiber. *Plant Cell Report* 29: 193-202.

- 128.** Li J., Yu M., Geng L. L., Zhao J. (2010b): The fasciclin-like arabinogalactan protein gene, *FLA 3*, is involved in microspore development of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 64: 482-497.
- 129.** Libik M., Konieczny R., Pater B., Slesak I., Miszalski Z. (2005): Differences in the activities of some antioxidant enzymes and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. *Plant Cell Report* 23: 834-841.
- 130.** Linsmaier E.M., Skoog F. (1965): Organic growth factor requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- 131.** Liskay A., Kenk B., Schopfer P. (2003): Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* 217: 658-667.
- 132.** Liu D., Tu L., Li Y., Wang L., Zhang X. (2008): Genes encoding fasciclin-like arabinogalactan proteins are specifically expressed during cotton fiber development. *Plant Molecular Biology Reporter* 26: 98-113.
- 133.** Loopstra C., Puryear J., No E. (2000): Purification and cloning of an arabinogalactan protein from xylem of loblolly pine. *Planta* 210: 686-689.
- 134.** Lucau-Danila A., Laborde L., Legrand S., Hout L., Hot D., Lemoine Y., Hilbert J. L., Hawkins S., Quillet M. C., Hendriks T., Blervacq A. S. (2010): Identification of novel genes potentially involved in somatic embryogenesis in chicory (*Cichorium intybus* L.). *BMC Plant Biology* 10: 122.
- 135.** Ma G., Xu Q. (2002): Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of cassava. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 70: 281-288.
- 136.** Ma G., Lu J., Teixeira da Silva J. A., Zhang X., Zhao J. (2011): Shoot organogenesis and somatic embryogenesis from leaf and shoot explants of *Ochna integerrima* (Lour). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104: 157-162.

137. Ma L., Xie L., Lin G., Jiang S., Chen H., Li H., Taka T., Šamaj J., Xu C. (2012): Histological changes and differences in activities of some antioxidant enzymes and hydrogen peroxide content during somatic embryogenesis of *Musa AAA.cv Yueyoukang 1*. *Scientia Horticulturae* 144: 87-92.
138. Ma H., Zhao J. (2010): Genome-wide identification, classification and expression analysis of the arabinogalactan protein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 61 (10): 2647-2668.
139. MacMillan C. P., Mansfield S. D., Stachuski Z. H., Evans R., Southerton S. G. (2010): Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *Plant Journal* 62: 689-703.
140. Mansion G. (2004): A new classification of the polyphyletic genus *Centaurium* Hill. (Chironiinae, Gentianaceae): description of the New World endemic *Zeltnera*, and reinstatement of *Gyrandra* Griseb. and *Schenkia* Griseb. *Taxon* 53(3): 719-740.
141. Mashigushi K., Yamaguchi I, Suzuki Y. (2004): Isolation and identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored arabinogalactan proteins and novel  $\beta$ -glucosyl Yariv-reactive proteins from seeds of rice (*Oryza sativa* L). *Plant and Cell Physiology*, 45: 1817-1829.
142. McCabe P. F., Valentine T. A., Scott F. L., Pennel R. I. (1997): Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. *Plant Cell* 9: 2225-2241.
143. Meratan A. A., Ghaffari S. M., Niknam V. (2009): *In vitro* organogenesis and antioxidative enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum*. *Biologia Plantarum* 53 (1): 5-10.
144. Meravy L. (1987): Phenolic substances in tissue culture of *Centaurium erythraea*. *Biologia Plantarum* 29(2): 81-87.
145. Milošević S., Simonović A., Cingel A., Jevremović S., Todorović S., Filipović B., Subotić A. (2012): Response of antioxidative enzymes to long-term *Tomato spotted wilt virus* infection and virus elimination by meristem-tip



- culture in two *Impatiens* species. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 79: 79-88.
146. Mithila J., Hall C. J., Victor J. M. R., Saxena P. K. (2003): Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). *Plant Cell Report* 21: 408-414.
  147. Mhamdi A., Queval S., Chaouch S., Vanderauwera F., Van Breusegem F., Noctor G. (2010): Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* 61:4197-4220.
  148. Moller I., Marcus S. E., Haeger A., Verhertbruggen Y., Verhoef R., Schols H., Ulvskov P., Mikkelsen D. J., Knox J.P., Willats W. (2008): High-throughput screening of monoclonal antibodies against plant cell wall glycans by hierarchical clustering of their carbohydrate microarray binding profiles. *Glycoconjugate Journal* 25: 37-48.
  149. Mok M. C., Mok D. W. S., Armstrong D. J., Shudo K., Isogai Y., Okamoto T. (1982): Cytokinin activity of *N*-fenil-*N'*-1,2,3-thidiazol-5-ylurean (thidiazuron). *Phytochemistry* 21: 1509-1511.
  150. Morini S., D'Onofrio C., Bellocchi G., Fisichella M. (2000): Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from in vitro cultured quince leaves. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 63: 47-55.
  151. Motose H., Sugiyama M., Fukuda H. (2004): A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. *Nature* 429: 873-878.
  152. Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.
  153. Namasivayam P., Skepper J. M., Hanke D. (2010): Distribution of arabinogalactan protein (AGP) epitopes on the anther-derived embryoid culture of *Brassica napus*. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 33(2): 303-313.
  154. Neill S., Desikan R., Hancock J. (2002): Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5:388-395.

- 155.** Nguema-Ona E., Coimbra S., Vire-Gibouini M., Mollet J., Driouch A. (2012): Arabinogalactan proteins in root and pollen-tube cells: distribution and functional aspects. *Annals of Botany* 110: 383-404.
- 156.** Norman P. M., Wingate V. P. M., Fitter M. S., Lamb C. J. (1986): Monoclonal antibodies to plant plasma membrane antigens. *Planta* 167: 452-459.
- 157.** Orbović V., Göllner E. M., Soria P. (2013): The effect of arabinogalactan proteins on regeneration potential of juvenile citrus explants used for genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Physiologia Plantarum* 35: 1409-1419.
- 158.** Orozco-Cardenas M., Ryan C. A. (1999): Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 110: 6553-6557.
- 159.** Pan X., Yang X., Lin G., Zou R., Chen H., Šamaj J., Xu C. (2011): Ultrastructural changes and the distribution of arabinogalactan proteins during somatic embryogenesis of banana (*Musa* spp. AAA cv. "Yueyoukang 1"). *Physiologia Plantarum* 142: 372-389.
- 160.** Pasternak T. P., Prinsen E., Ayaydin F., Miskolczi P., Potters G., Asard H., Van Onckelen H. A., Dudits D., Feher A. (2002): The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology* 129: 1807-1819.
- 161.** Passardi F., Penel C., Dunand C. (2004): Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* 9: 534-540.
- 162.** Patel N., Snow P. M., Goodman C. S. (1987): Characterization and cloning of fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* 48: 975-988.

- 163.** Pennel R. I., Janniche L., Kjellbom P., Scofield G. N., Peart J. M., Roberts K. (1991): Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers. *The Plant Cell* 3: 1317-1326.
- 164.** Pennel R. I., Knox J. P., Scofield G. N., Selvendran R. R., Roberts K. (1989): A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants. *Journal of Cell Biology* 108: 1967-1977.
- 165.** Petersen T. N., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. (2011): SignalIP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8: 785-786.
- 166.** Phillips G. C. (2004): *In vitro* morphogenesis in plants-recent advances. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 40: 342-345.
- 167.** Piatczak E., Chmiel A., Wysokinska H. (2005a): Mist trickling bioreactor for *Centaureum erythraea* Rafn. growth of shoots and production of secoiridoids. *Biotechnology Letters* 27(10): 721-724.
- 168.** Piatczak E., Krolicka A., Wysokinska H. (2006): Genetic transformation of *Centaureum erythraea* Rafn. by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of secoiridoids. *Plant Cell Reports* 25(12): 1308-1315.
- 169.** Piatczak E., Wielanek M., Wysokinska H. (2005b): Liquid culture system for shoot multiplication and secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaureum erythraea* Rafn. *Plant Science* 168(2): 431-437.
- 170.** Piatczak E., Wysokinska H. (2003): *In vitro* regeneration of *Centaureum erythraea* Rafn. from shoot tips and other seedling explants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 72(4): 283-288.
- 171.** Pilarska M. J., Knox P. J., Konieczny R. (2013): Arabinogalactan-protein and pectin epitopes in relation to an extracellular matrix surface network and somatic embryogenesis and callogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 115: 35-44.

172. Popper Z. A. (2011): Extraction and detection of arabinogalactan proteins. In: *The Plant Cell Wall: Methods in Molecular Biology*. Zoë Popper (ed.) Springer Verlag New York, USA, Vol 715: 245-254.
173. Poon S., Heath L. R., Clarke E. A. (2012): A chimeric arabinogalactan protein promotes somatic embryogenesis in cotton cell culture. *Plant Physiology* 160: 684-695.
174. Qi W., Fong C., Lamport D. T. A. (1991): Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope: a new model based on *O*-galactosylhydroxyproline as the polysaccharide attachment site. *Plant Physiology* 96: 848-855.
175. Quiroz-Figueroa F. R., Rafael R. H., Galaz-Avalos R. M., Loyola-Vargas V. M. (2006): Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86:258-301.
176. Ramachandra R. S., Ravishankar G. A. (2002): Plant Cell Cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153.
177. Rajeswari V., Paliwal K. (2008): Peroxidase and catalase changes during in vitro adventitious shoot organogenesis from hypocotyls of *Albizia odoratissima* L. f. (Benth). *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 825-832.
178. Reinert J. (1958): Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. *Naturwissenschaften* 45: 344-347.
179. Reuveni M., Evenor D. (2007): On the effect of light on shoot regeneration in petunia. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 89: 49-54.
180. Saare-Surminski K., Preil W., Knox J. P., Liberei R. (2000): Arabinogalactan- proteins in embryogenic and non-embryogenic callus cultures of *Euphorbia pulcherrima*. *Physiologia Plantarum* 108: 180-187.
181. Sardar H. S., Yang J., Showalter A. M. (2006): Molecular interactions of arabinogalactan proteins with cortical microtubules and F-actin in Bright Yellow-2 tobacco cultured cells. *Plant Physiology* 142: 1469-1479.

- 182.** Schopfer (2001): Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *Plant Journal* 28: 679-688.
- 183.** Schultz C., Gilson P., Oxley D., Youl J., Bacic A. (1998): GPI-anchors on arabinogalactan proteins: implications for signaling in plants. *Trends in Plant Science* 3: 426-431.
- 184.** Schultz C., Johnson K. L., Currie G., Bacic A. (2000): The classical arabinogalactan protein gene family of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 1: 1751-1768.
- 185.** Schultz C. J., Rumsewicz M. P., Johnson K. L., Jones B. J., Gaspar Y. M., Bacic A. (2002): Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case. *Plant Physiology* 129: 1448-1463.
- 186.** Seifert G. J., Blaukopf C. (2010): Irritable walls: the plant extracellular matrix and signaling. *Plant Physiology* 153: 467-478.
- 187.** Seifert J. G., Roberts K. (2007): The biology of arabinogalactan proteins. *The Annual Review of Plant Biology* 58: 137-161.
- 188.** Serpe D. M., Nothangel E. A. (1994): Effects of Yariv phenylglycosides on rosa cell suspensions: evidence for the involvement of arabinogalactan proteins in cell proliferation. *Planta* 193: 542-550.
- 189.** Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessaraki M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012: 1-26.
- 190.** Shi H., Kim Y. S., Guo Y., Stevenson B., Zhu J. K. (2003): The *Arabidopsis SOS5* locus encodes a putative cell surface adhesion protein and is required for normal cell expansion. *Plant Cell* 15: 19-32.
- 191.** Showalter A. M. (2001): Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 1399-1417.
- 192.** Showalter A. M., Keppler B., Lichtenberg J., Gu D., Welch, L. R. (2010): A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiology* 153: 485-513.

- 193.** Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Soding J., Thompson J. D., Higgins D. G. (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7: 539.
- 194.** Simonović A (2011): *Biotehnologija i genetičko inženjerstvo biljaka*, str. 317. NNK internacional, Beograd.
- 195.** Simonović A., Filipović B., Trifunović M., Malkov S., Milinković V., Jevremović S., Subotić A. (2015): Plant regeneration in leaf culture of *Centaurea erythraea* Rafn. Part 2: the role of arabinogalactan proteins. *Plant Cell Tissue Organ Culture* DOI 10.1007/s11240-015-0741-3.
- 196.** Singh C. K., Raj S. R., Patil V. R., Jaiswal P. S., Subhash N.(2013): Plant regeneration from leaf explants of mature sandalwood (*Santalum album* L.) trees in vitro conditions. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 49: 216-222.
- 197.** Skoog F., Miller C.O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symposium of Society of Experimental Biology* 11: 118-131.
- 198.** Skrzypczak L., Wesolowska M., Skrzypczak E. (1993): *Gentiana* species: *In vitro* culture, regeneration and production of secoiridoid glucosides. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol. 21 *Medicinal and Aromatic Plants IV*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 172-186.
- 199.** Slesak I., Libik M., Karpinska B., Karpinski S., Libik M., (2007): The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica* 54 (1): 39-50.
- 200.** Slesak I., Slesak A., Libik M., Libik M. (2008): Antioxidant response system in the short-term post-wounding effect in *Mesembryanthemum crystallinum* leaves. *Journal of Plant Physiology* 165: 127-137.
- 201.** Smallwood M., Beven A., Donovan N., Neill S. J., Peart J., Roberts K., Knox J. P. (1994): Localization of cell wall protein in relation to the developmental anatomy of the carrot root apex. *The Plant Journal* 5: 237-246.

- 202.** Smallwood M., Yates E. A., Willats W. G. T., Martin H., Knox J. P. (1996): Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta* 198: 452-459.
- 203.** Smertenko A., Bozhkov P. V. (2014): Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. *Journal of Experimental Botany* 65(5): 1343-1360.
- 204.** Somleva M., Alexieva V., Sergiev I., Karanov E. (2000): Alterations in the activities of some hydrogen peroxide scavenging enzymes during induction of somatic embryogenesis in leaf explants from *Dactylis glomerata* L. *Dokladi na Blgarskata Akademiya na Naukite* 53(4): 91-94.
- 205.** Sriskandarajah S., Goodwin P. (2005): *In vitro* propagation of *Tasmania stipitata* AC Smith. *Propagation of Ornamental Plants* 5(2): 95-99.
- 206.** Sriskandarajah S., Lundquist P.O. (2009): High frequency shoot organogenesis and somatic embryogenesis in juvenile and adult tissues of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 99: 259-268.
- 207.** Stacey N. J., Roberts K., Knox J. P. (1990): Patterns of expression of the JIM4 arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. *Planta* 180: 285-292.
- 208.** Steffan W., Kova P., Albershaim P., Darvill A. G., Hahn M. G. (1995): Characterisation of a monoclonal antibody that recognizes an arabinosylated  $\beta$ -1,6-D-galactan epitope in plant complex carbohydrates. *Carbohydrate Research* 275: 295-307.
- 209.** Steinmacher D. A., Saare-Surminski K., Liberei R. (2012): Arabinogalactan proteins and the extracellular matrix surface network during peach palm somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 146: 336-349.
- 210.** Steward F. C., Mapes M. O., Mears K. (1958): Growth and organized development of cultured cells. II. Organization of cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*. 45:705-708.

211. Su Y. H., Zhao X. Y., Liu Y. B., Zhang C. L., O'Neill S. D., Zhang X. S. (2009): Auxin-induced WUS expression is essential for embryogenic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 59: 448-460.
212. Subotić A., Budimir S., Grubišić D., Momčilović I. (2003/4): Direct regeneration of shoots from hairy root cultures of *Centaurea erythraea* inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*. *Biologia Plantarum* 47(4): 617-619.
213. Subotić A., Grubišić D. (2007): Histological analysis of somatic embryogenesis and adventitious formation from root explants of *Centaurea erythraea* Gillib. *Biologia Plantarum* 51 (3): 514-516.
214. Subotić A., Janković T., Jevremović S., Grubišić D. (2006): Plant tissue culture and secondary metabolites productions of *Centaurea erythraea* Rafn., a medicinal plant. In: Teixeira da Silva JA, (ed.), *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. Global Science Books UK, Vol. II, pp. 564-570.
215. Subotić A., Jevremović S., Grubišić D. (2009a): Influence of cytokinins on *in vitro* morphogenesis in root cultures of *Centaurea erythraea*-Valuable medicinal plant. *Scientia Horticulturae* 120(3): 386-390.
216. Subotić A., Jevremović S., Grubišić D., Janković T. (2009b): Spontaneous plant regeneration and production of secondary metabolites from hairy root cultures of *Centaurea erythraea* Rafn. In: *Protocols for in vitro cultures and secondary metabolite analysis of aromatic and medicinal plants*. S.M. Jain, P.K. Saxena (eds.), Series: *Methods in Molecular Biology*, Springer Vol. 547, pp. 205-217.
217. Subotić A., Jevremović S., Trifunović M., Petrić M., Milošević S., Grubišić D. (2009c): The influence of gibberelic acid and paclobutrazol on induction of somatic embryogenesis in wild type and hairy root cultures of *Centaurea erythraea* Gillib. *African Journal of Biotechnology* 8(14): 3223-3228.



- 218.** Subotić A., Trifunović M., Jevremović S., Petrić M. (2010): Morpho-histological study of direct somatic embryogenesis in endangered species *Fritillaria meleagris*. *Biologia Plantarum* 54 (3): 592-596.
- 219.** Sun W., Xu J., Yang J., Kieliszewski M. J., Showalter A. M. (2005): The lysine-rich arabinogalactan-protein subfamily in *Arabidopsis*: gene expression, glycoprotein purification and biochemical characterization. *Plant and Cell Physiology* 46: 975-984.
- 220.** Šamaj J., Baluška F., Bobak M., Volkman D. (1999): Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. *Plant Cell Reports* 18: 369-374.
- 221.** Tan L., Showalter M. A., Egelund J., Hernandez-Sanchez A., Doblin S. M., Bacic A. (2012): Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans. *Frontiers in Plant Science (Plant Physiology)*, Vol. 3(140): 1-10.
- 222.** Tang X. C., He Y. Q., Wang Y., Sun M. X. (2006): The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell development fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Journal of Experimental Botany* 57 (11): 2639-2650.
- 223.** Tchorbadjieva M. I. (2005): Protein markers for somatic embryogenesis. In: *Plant Cell Monogr* (2) Mujib A., Šamaj J. (eds.), Somatic embryogenesis. Springer, Verlag Berlin Heidelberg pp. 215-233.
- 224.** Tchorbadjieva M. I., Pantchev I. (2006): Secretion of chitinase-like protein in embryogenic suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. *Biologia Plantarum* 50: 142-145.
- 225.** Thomson H. J. M., Knox J. P. (1998): Stage-specific responses of carrot embryogenic carrot cell suspension cultures to arabinogalactan protein binding  $\beta$ -glucosil Yariv reagent. *Planta* 205: 32-38.
- 226.** Tian J., Jiang F., Wu Z. (2015): The apoplastic oxidative burst as a key factor of hyperhydricity in garlic plantlet *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 120: 571-578.

- 227.** Tian M., Gu Q., Zhu M. (2003): The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry calus. *Plant Science* 165: 701-707.
- 228.** Trifunović M., Cingel A., Simonović A., Jevremović S., Petrić M., Dragičević I. Č., Motyka V., Dobrev P. I., Zahajska L., Subotić A. (2013): Overexpression of *Arabidopsis* cytokinin oxidase/dehydrogenase genes AtCKX1 and AtCKX2 in transgenic *Centaureum erythraea* Rafn. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 115(2): 139-150.
- 229.** Trifunović M., Tadić V., Petrić M., Jontulović D., Jevremović S., Subotić A. (2014): Quantification of arabinogalactan proteins during in vitro morphogenesis induced by  $\beta$ -D glucosyl Yariv reagent in *Centaureum erythraea* root culture. *Acta Physiologia Plantarum* 36: 1187-1195.
- 230.** Unda F., Kalynyak P., Riseman A. (2007): Organogenesis plant regeneration from leaf explants of *Exacum* Styer Group. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 89: 105-111.
- 231.** Vágnerova H. (1992): Micropropagation of common centaury (*Centaureum erythraea* Rafn.). In: Bajaj YPS (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tech and Micropropagation III*. Springer, Berlin, pp. 388-399.
- 232.** Valentao P., Andrade P. B., Silva E., Vincente A., Santos H., Bastos M. L., Seabra R. (2002): Methoxylated xanthenes in the quality control of small centaury (*Centaureum erythraea*) flowering tops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 460-463.
- 233.** van den Bosch K. A., Bradley D. J., Knox J. P., Perotto S., Butcher G. W., Brewin N. J. (1989): Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *EMBO Journal* 8: 335-341.
- 234.** Van der Sluis W.G. (1985): Chemotaxonomical investigations of the Genera *Blackstonia* and *Centaureum* (*Gentianaceae*). *Plant Systematics and Evolution* 149: 253-286.
- 235.** Van der Sluis W.G. Van der Nat J. M., Spek A. L., Ikeshiro Y., Labadie R. P. (1983): Secoiridoids and xanthenes in the genus *Centaureum*. Part VI:

- gentiogenal, a conversion product of gentiopicrin (gentiopicroside). *Planta Medica* 49: 211-215.
- 236.** van Hengel A. J., Roberts K. (2003): AtAGP30, an arabinogalactan-protein in the cell walls of the primary root, plays a role in root regeneration and seed germination. *Plant Journal* 36: 256-270.
- 237.** van Hengel A. J., Tadesse Z., Immerzeel P., Schols H., van Kammen A., de Vries S. C. (2001): *N*-Acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiology* 125: 1880-1890.
- 238.** van Hengel A. J., van Kammen A., de Vries S. C. (2002): A relationship between seed development, arabinogalactan-proteins (AGPs) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum* 114: 637-644.
- 239.** Van Holst G. J., Clarke A. E. (1986): Organ-specific arabinogalactan-proteins of *Lycopersicon peruvianum* (Mill.) demonstrated by crossed electrophoresis. *Plant Physiology* 80: 786-789.
- 240.** Van Holst G. J., Clarke A. E. (1985): Quantification of arabinogalactan-protein in plant extract by single radial diffusion. *Annals of Biochemistry* 148, 446-450.
- 241.** Vinterhalter B., Vinterhalter D. (2002): Propagation of *Chelidonium majus* L. by somatic embryogenesis. *Biologia Plantarum* 45: 489-493.
- 242.** Wang L., An L., Hu Y., Wei L., Li Y. (2009): Influence of phytohormones and medium on the shoot regeneration from leaf of *Swertia chirata* Buch.-Ham. Ex wall. in vitro. *African Journal of Biotechnology* 8: 2513-2517.
- 243.** Waterhouse A. M., Procter J. B., Martin D. M. A., Clamp M., Barton G. J. (2009): Jalwiev version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189-1191.

244. Willats G. T. W., Knox J. P. (1996): A role for arabinogalactan-proteins in plant cell expansion: evidence from studies on the interaction of  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent with seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 9: 919-925.
245. Willekens H., Inze D., Van Montagu M., Van Camp W. (1995): Catalases in plants. *Molecular Breeding* 1: 207 – 228.
246. Williams E. G., Maheswaran G. (1986): Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57: 443-462.
247. Wiśniewska E., Majewska-Sawka A. (2007): Arabinogalactan-proteins stimulate the organogenesis of guard cell protoplasts-derived callus in sugar beet. *Plant Cell Report* 26: 1457-1467.
248. Woodbury W., Spencer A. K. , Stahmann M. A. (1971): An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry* 44, 301-305.
249. Xie D., Ma L., Šamaj J., Xu C. (2011): Immunohistochemical analysis of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins in the roots of resistant and susceptible wax gourd cultivars in response to *Fusarium oxysporium* f.sp. Benincase infection and fusaric acid treatment. *Plant Cell Report* 30: 155-1569.
250. Xu Q., Bateman A., Finn F.D., i sar. (2010): Bacterial pleckstrin homology domains: A Prokaryotic Origin for the PH domain. *Journal of Molecular Biology* 12, 396 (1): 31-46.
251. Yahraus T., Sreeganga C., Legendre L., Low P. S. (1995): Evidence for a mechanically induced oxidative burst. *Plant Physiology* 109: 1259-1266.
252. Yang X., Lu J., Teixeira da Silva J. M., Ma G. (2012): Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from leaf explants of *Primulina tabacum*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 109: 213-221.
253. Yang J., Sardar H. S., McGovern K. R., Zhang Y., Showalter A. M. (2007): A lysine-rich arabinogalactan-protein in *Arabidopsis* is essential for

- plant growth and development, including cell division and expansion. *Plant Journal* 49: 629-640.
- 254.** Yang S. H., Wang H. Y., Sathyan P., Stassola C., Loopstra C. A. (2005): Real-time RT-PCR analysis of loblolly pine (*Pinus taeda*) arabinogalactan-protein and arabinogalactan-protein-like genes. *Physiologia Plantarum* 124: 91-106.
- 255.** Yang J., Zhang Y., Liang J., Showalter A. M. (2011): Expression analyses of AtAGP17 and AtAGP19, two lysine-rich arabinogalactan proteins, in *Arabidopsis*. *Plant Biology* 13: 431-438.
- 256.** Yariv J., Lis H., Katchalski E. (1967): Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochemical Journal* 105: 1-2.
- 257.** Yariv J., Rapport M. M., Graf L. (1962): The interaction of glycosides and saccarides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochemical Journal* 85: 383-388.
- 258.** Yates E. A., Knox J. P. (1994): Investigations into the occurrence of plant cell surface epitopes in exudate gums. *Carbohydrate Polymers* 24: 281-286.
- 259.** Yates E. A., Valdor J-F., Haslam S. M. (1996): Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* 6: 131-139.
- 260.** Yu M., Zhao J. (2012): The cytological changes of tobacco zygote and proembryo cells induced by beta-glucosyl Yariv reagent suggest the involvement of arabinogalactan proteins in cell division and cell plate formation. *BMC Plant Biology* 12: 1-16.
- 261.** Zavattieri M. A., Frederico A. M., Lima M., Sabino R., Amhold-Schmidt B. (2010): Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reaction. *Electronic Journal of Biotechnology* 13: 1-13.
- 262.** Zhang Q., Chen J., Henny R. J. (2005): Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf, petiole, and stem explants of Golden Pothos. *Plant Cell Report* 23: 587-595.

- 263.** Zhang Y., Yang J., Showalter A. M. (2011): AtAGP18, a lysine-rich arabinogalactan protein in *Arabidopsis thaliana*, functions in plant growth and development as a putative co-receptor for signal transduction. *Plant Signaling&Behavior* 6: 855-857.
- 264.** Zhao Y. X., Su Y. H., Cheng Z. J., Zhang X. S. (2008): Cell fate switch during *in vitro* plant organogenesis. *Journal of integrative palnt biology* 50 (7): 816-824.
- 265.** Ziv M. (1991): Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh PC & Zimmerman RH (eds.) *Micropropagation: Technology and Application* Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, pp. 45-70.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Biljana K. Filipović (rođ. Nikolić) rođena je 12.juna 2015. godine u Leskovcu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala školske 1995/1996. Fakultet je završila 2004. godine sa prosečnom ocenom 9,25. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, u okviru studijskog programa Fiziologija i molekularna biologija biljaka upisala je školske 2006/2007. godine.

Od februara 2005. godine radi kao istraživač pripravnik u Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 03.03.2009. godine.

Trenutno je Biljana K. Filipović angažovana na nacionalnom projektu „Fizološka, hemijska i molekularna analiza diverziteta retkih i ugroženih biljnih vrsta u cilju *ex situ* zaštite i produkcije biološki aktivnih jedinjenja“ (ON173024) i na tehnološkom projektu „Razvoj i primena biotehnoloških postupaka u dobijanju zdravog sadnog materijala ukrasnih biljaka“ (TP31019). U prethodnom periodu je Biljana K. Filipović bila angažovana na dva nacionalna projekta: „Vegetativno i generativno razmnožavanje *in vitro* ugroženih biljnih vrsta u cilju *ex situ* zaštite i produkcije sekundarnih metabolita“ (2002-2005), kao i na „Svetlosna i hormonalna kontrola rasteња i razvića biljaka, razmnožavanje *in vitro* i *ex situ* zaštita retkih i ugroženih vrsta“ (2006-2010), i na međunarodnom projektu „Plant Terpenoids for Human Health: a chemical and genomic approach to identify and produce bioactive compounds“ (Grant Agreement No.227448) FP7 (2009-2014).

Biljana K. Filipović je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Биљана Филиповић \_\_\_\_\_

број уписа \_\_\_\_\_ ЕА060007 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога арабиногалактанских протеина у процесу морфогенезе *in vitro* код

\_\_\_\_\_ кичице (*Centaurium erythraea* Rafn.) \_\_\_\_\_

- 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, \_\_\_\_\_ 06.05.2015. \_\_\_\_\_

Филиповић Биљана



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Биљана Филиповић

Број уписа ЕА060007

Студијски програм Физиологија и молекуларна биологија биљака

Наслов рада Улога арабиногалактанских протеина у процесу морфогенезе *in vitro*  
код кичице (*Centaurium erythraea* Rafn.)

Ментор др Ангелина Суботић

Потписани Биљана Филиповић

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, 06.05.2015.

Филиповић Биљана

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Улога арабиногалактанских протеина у процесу морфогенезе *in vitro* код кичице

(*Centaurium erythraea* Rafn.)

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, \_\_\_\_\_ 06.05.2015. \_\_\_\_\_

Филиповић Биљана

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.