

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marija P. Petrić

**FIZIOLOŠKI I BIOHEMIJSKI ASPEKTI
REGENERACIJE KOŠUTICE
(*Fritillaria meleagris* L.) *IN VITRO***

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marija P. Petrić

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL
ASPECTS OF REGENERATION OF
SNAKE'S HEAD FRITILLARY
(*Fritillaria meleagris* L.)
*IN VITRO***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Dr Angelina Subotić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - IBISS - mentor

Dr Ivana Dragičević, docent, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet, mentor

Dr Slađana Jevremović, viši naučni saradnik Univerzitet u Beogradu – IBISS- član

Datum odbrane: _____

Ova disertacija urađena je u Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja »Siniša Stanković« Univerziteta u Beogradu.

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru dr Angelini Subotić na nesebičnoj pomoći, neprocenjivim savetima, razumevanju, podršci i strpljenju tokom niza godina zajedničkog rada kao i tokom izrade ove doktorske disertacije. Iskrenu zahvalnost upućujem dr Ivani Dragičević koja je odgovorno, predano i kritički pristupila uobličavanju ove doktorske disertacije. Dr Slađani Jevremović dugujem veliku zahvalnost za brojne savete koji se tiču eksperimentalnog dela disertacije, ali i za stručnu i uvek prisutnu pomoć prilikom pisanja doktorske disertacije i rešavanja pojedinih problema na koje sam nailazila.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Snežani Milošević na velikoj pomoći prilikom eksperimentalne analize antioksidativnih enzima i fotosintetičkih pigmenata.

Milani Trifunović i Vojinu Tadiću zahvaljujem se za pomoć prilikom eksperimentalne analize arabinogalaktanskih proteina.

Hemijsku analizu esteraznih proteina uradili su dr Zoran Vujčić i Marica Grujić na Hemijskom fakultetu u Beogradu kojima se ovom prilikom srdačno zahvaljujem.

Hemijska ispitivanja šećera u lukovicama, HPLC metodom, uradio je dr Vuk Maksimović sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja u Beogradu, kome se iskreno zahvaljujem.

Zahvaljujem se svim kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" koji su na bilo koji način učestvovali u izradi ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem mojoj porodici i prijateljima na podršci koju su mi davali godinama unazad i sa mnom istrajali u dobrim i lošim trenucima. Naročito bih se zahvalila Jevremu Živanoviću, profesoru srpskog jezika i književnosti na vremenu koje je izdvojio za lekturu ove disertacije.

FIZIOLOŠKI I BIOHEMIJSKI ASPEKTI REGENERACIJE KOŠUTICE (*Fritillaria meleagris* L.) *IN VITRO*

REZIME

Proučavana je *in vitro* regeneracija košutice (*Fritillaria meleagris*), višegodišnje lukovičaste geofite. Indukcija morfogeneze *in vitro* košutice postignuta je u kulturi zrelih zigotskih embriona, segmenata lukovica kao i bazalnih delova listova *in vitro* formiranih lukovica. U kulturi zrelih zigotskih embriona regeneracija biljaka je postignuta procesom somatske embriogeneze i organogeneze u isto vreme i na istom eksplantatu na hranljivoj podlozi bez regulatora rastanja ili hranljivoj podlozi obogaćenju sa TDZ. U kulturi segmenata *in vitro* formiranih lukovica indukcija morfogeneze postignuta je na hranljivoj podlozi sa 2,4-D ili TDZ na svetlosti ili u mraku. Regeneracija biljaka je bila postignuta na obe hranljive podloge putem somatske embriogeneze i organogeneze, s tim da je regeneracija putem organogeneze bila uspešnija na hranljivoj podlozi obogaćenju sa TDZ. U kulturi bazalnih delova listova indukovana je somatska embriogeneza na hranljivim podlogama sa 2,4-D, KIN ili 2,4-D i KIN. Anatomska istraživanja su pokazala da je somatska embriogeneza direktna, a somatski embrioni imaju višćelijsko poreklo i nastaju od epidermalnih i subepidermalnih slojeva ćelija bazalnih delova lista. Ispitan je uticaj niskih temperatura (15 i 4 °C), povećane koncentracije saharoze u hranljivoj podlozi kao i predtretman sa GA₃ na rastenje, razviće i prevazilaženje dormancije *in vitro* formiranih lukovica košutice. Pokazano je da predhodno gajenje lukovica na sniženim temperaturama i hranljivoj podlozi sa 4,5 % saharoze pozitivno utiče na rastenje i umnožavanje lukovica. Pored toga, predtretman rastvorom GA₃ pre izlaganja lukovica niskoj temperaturi (4 °C) dovodi do stimulacije umnožavanja i klijanja lukovica. Izlaganjem *in vitro* formiranih lukovica košutice niskoj temperaturi dolazi do promena u sadržaju šećera (saharoze, glukoze i fruktoze), fotosintetičkih pigmenata i poliola. Ispitana je aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GR i POX) tokom prevazilaženja dormancije lukovica gajenjem na niskoj temperaturi. Analize su pokazale da enzimi antioksidativnog stresa aktivno učestvuju u procesima prekidanja dormancije *in vitro* formiranih lukovica košutice, kao i aklimatizacije lukovica na *ex vitro* uslove. Enzimi antioksidativne zaštite su aktivni i tokom

indukcije morfogeneze košutice u kulturi segmenata lukovica, a njihova aktivnost zavisi od sastava hranljive podloge i predtretmana kome su lukovice prethodno izložene. Zimogramskom detekcijom esteraza tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenata lukovica utvrđeno je prisustvo 6 izoformi i njihova aktivnost kao i zastupljenost pojedinih izoformi zavise takođe od predtretmana na kojima su lukovice prethodno gajene kao i od regulatora rastjenja u hranljivoj podlozi. Praćena je promena sadržaja arabinogalaktanskih proteina (AGP) u eksplantatima tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi bazalnih delova listova i segmenata lukovica na dve hranljive podloge obogaćene sa 2,4-D i KIN ili TDZ. Koncentracija AGP u eksplantatima se povećava već posle 7 dana gajenja bazalnih delova listova odnosno posle 21 dana gajenja segmenata lukovica na hranljivim podlogama sa regulatorima rastjenja. Koncentracija AGP je veća u bazalnim segmentima lista gajenim na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN nego na hranljivoj podlozi sa TDZ. Analizom profila AGP dobijenog ukrštenom elektroforezom pokazano je prisustvo samo jednog tipa AGP tokom indukcije morfogeneze *in vitro*.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija biljaka

UDK broj: 581.1(043.3)

Ključne reči: *Fritillaria meleagris*, morfogeneza *in vitro*, dormancija lukovica, organogeneza, oksidativni stres, somatska embriogeneza, antioksidativni enzimi, esteraze, arabinogalaktanski proteini

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF SNAKE'HEAD
FRITILLARY (*Fritillaria meleagris* L.) REGENERATION *IN VITRO*
ABSTRACT**

We have investigated *in vitro* regeneration of snake'head fritillary (*Fritillaria meleagris* L.), a perennial bulbous geophyte. The induction of morphogenesis *in vitro* of snake'head fritillary was achieved in mature zygotic embryo culture, scale segment and leaf base culture of *in vitro* formed bulbs. Plant regeneration *via* somatic embryogenesis and organogenesis was obtained in mature zygotic embryo culture on a growth regulator-free medium or on medium supplemented with TDZ. The induction of morphogenesis *in vitro* was achieved in scale segment culture of the *in vitro* formed bulbs on media supplemented with 2,4-D or TDZ, grown either on light or in darkness, with more efficient regeneration on media supplemented with TDZ. Somatic embryogenesis was induced in leaf base culture of the *in vitro* formed plants on media with 2,4-D, KIN or 2,4-D and KIN. Anatomical studies revealed that the somatic embryogenesis was direct, with somatic embryos of multicellular origin formed from epidermal and subepidermal leaf base cells. The effect of low temperature (4 and 15 °C), higher concentration of sucrose in the nutritional media and GA₃ pretreatment on growth, differentiation and dormancy breaking of the *in vitro* formed bulbs was investigated. It was shown that pre-cultivation of the *in vitro* regenerated bulbs at lower temperatures and higher concentration of sucrose in the nutrition media (4,5 %) have stimulatory effect on growth and multiplication of the bulbs. Also, GA₃ pretreatment followed by cultivation at low temperature (4 °C) had a stimulatory effect on multiplication and germination of the bulbs. Cultivation at low temperature breaks dormancy of the bulbs and causes changes in the sugar content (sucrose, glucose and fructose), photosynthetic pigments and polyols. Activity of antioxidative enzymes (SOD, CAT, GR i POX) during dormancy breaking was investigated. It was shown that these enzymes are actively involved in dormancy breaking of the *in vitro* formed bulbs, and in the process of acclimatization of the bulbs to *ex vitro* conditions. Antioxidative enzymes were active during the induction of morphogenesis *in vitro* in bulb segment culture and their activity depended on the nutritional media and the pretreatment to which the bulbs

were exposed. During morphogenesis *in vitro* in the scale segment culture of snake's head fritillary, up to 6 esterase isoforms have been detected, depending on the pretreatment and media composition. The content of arabinogalactan proteins (AGPs) in explants during the induction of morphogenesis *in vitro* in leaf base and scale segment cultures at media supplemented either with 2,4-D and KIN or with TDZ was determined. Concentration of AGPs increased after seven days of cultivation of explants on media with growth regulators in the leaf base culture and 21 days in the scale segment culture. In the leaf base culture, concentration of AGPs in explants was higher on a medium with 2,4-D and KIN than on a medium with TDZ. The AGP profile obtained by crossed electroforesis revealed the presence of one AGP type during induction of morphogenesis *in vitro* of *F. meleagris*.

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Plant Physiology

UDC number: 581.1(043.3)

Key words: *Fritillaria meleagris*, morphogenesis *in vitro*, bulb dormancy, organogenesis, oxidative stress, somatic embryogenesis, antioxidative enzymes, esterases, arabinogalactan proteins

SADRŽAJ

REZIME

SKRAĆENICE

1. UVOD	1
1.1. Morfogeneza biljaka u uslovima <i>in vitro</i>	1
1.1.1. Organogeneza i somatska embriogeneza	1
1.1.2. Biohemijski aspekti somatske embriogeneze	7
1.1.2.1. Arabinogalaktanski proteini (AGP)	9
1.1.2.2. Opšte odlike esteraza	13
1.2. Oksidativni stres kod biljaka	15
1.2.1. Antioksidativni enzimi biljaka	18
1.2.1.1. Superoksid dismutaze (SOD)	18
1.2.1.2. Katalaze (CAT)	19
1.2.1.3. Peroksidaze (POX)	20
1.2.1.4. Glutation reduktaza (GR)	21
1.2.2. Oksidativni stres kod biljaka tokom morfogeneze <i>in vitro</i>	22
1.3. Opšte karakteristike roda <i>Fritillaria</i>	24
1.3.1. Opšte karakteristike košutice (<i>F. meleagris</i> L.)	26
1.4. Razmnožavanje biljaka vrsta roda <i>Fritillaria</i>	27
1.4.1. Vegetativno i generativno razmnožavanje biljaka vrsta roda <i>Fritillaria</i>	27
1.4.2. Regeneracija biljaka vrsta roda <i>Fritillaria in vitro</i>	28
1.4.2.1. Regeneracija biljaka vrsta roda <i>Fritillaria</i> putem organogeneze	28
1.4.2.2. Regeneracija biljaka vrsta roda <i>Fritillaria</i> somatskom embriogenezom	33
2. CILJ	36
3. MATERIJAL I METODE	37
3.1. Biljni materijal	37
3.2. Priprema biljnog materijala za eksperiment	37
3.3. Osnovna hranljiva podloga	39
3.3.1. Hranljive podloge za indukciju morfogeneze <i>in vitro</i> u kulturi zrelih zigotskih embriona	40
3.3.2. Indukcija morfogeneze <i>in vitro</i> u kulturi segmenata lukovica	40
3.3.3. Indukcija morfogeneze <i>in vitro</i> u kulturi baze lista	40
3.3.4. Ispitivanje rastenja i razvića lukovica	41
3.4. Gajenje u <i>ex vitro</i> uslovima	41
3.5. Anatomska istraživanja indukcije somatske embriogeneze	41
3.6. Analiza šećera i poliola	42
3.7. Određivanje sadržaja hlorofila i karotenoida u lukovicama	42
3.8. Analiza antioksidativnih enzima	43
3.8.1. Izolacija i kvantifikacija ukupnih proteina	43
3.8.2. Kvantifikacija aktivnosti superoksid dismutaze	44
3.8.2.1. Detekcija aktivnosti superoksid dismutaze	45
3.8.3. Kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza	46
3.8.4. Kvantifikacija aktivnosti ukupnih peroksidaza	47
3.8.4.1. Zimografska detekcija peroksidaza	47

3.8.5. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze	48
3.8. Zimografska detekcija esteraza	48
3.10. Analiza arabinogalaktanskih proteina	49
3.10.1. Izolacija AGP	49
3.10.2. Određivanje koncentracije AGP	49
3.10.3. Određivanje kvalitativnih osobina AGP	50
3.11. Statistička obrada podataka	51
4. REZULTATI	52
4.1. Kultura zrelih zigotskih embriona <i>F. meleagris</i> L.	52
4.1.1. Indukcija morfogeneze <i>in vitro</i> u kulturi zrelih zigotskih embriona <i>F. meleagris</i> L.	52
4.1.2. Uticaj niske temperature (4 °C) na rastenje i razviće <i>in vitro</i> formiranih lukovica	54
4.1.3. Uticaj niske temperature (4 °C) na sadržaj vode, rastvorljivih šećera, poliola i fotosintetičkih pigmenata u lukovicama <i>F. meleagris</i> formiranim <i>in vitro</i>	57
4.1.4. Uticaj povećane koncentracije saharoze na rastenje lukovica formiranih <i>in vitro</i>	58
4.1.5. Uticaj temperature i dužine gajenja na umnožavanje i rastenje lukovica	59
4.1.6. Uticaj GA ₃ na rastenje i razviće lukovica gajenih na 4 °C	62
4.1.7. Aklimatizacija biljaka	65
4.2. Biohemijski aspekti razvića lukovica <i>F. meleagris</i> L.	66
4.2.1. Aktivnost antioksidativnih enzima kod lukovica gajenih <i>in vitro</i>	66
4.2.2. Aktivnost antioksidativnih enzima kod lukovica gajenih <i>ex vitro</i>	68
4.3. Indukcija morfogeneze u kulturi segmenata lukovica formiranih <i>in vitro</i>	70
4.4. Indukcija morfogeneze u kulturi baze lista biljaka <i>F. meleagris</i> L. gajenih <i>in vitro</i>	75
4.4.1. Anatomska istraživanja somatske embriogeneze u kulturi baze lista biljaka	79
4.5. Biohemijski aspekti indukcije <i>in vitro</i> morfogeneze <i>F. meleagris</i>	82
4.5.1. Kvantifikacija antioksidativnih enzima tokom indukcije morfogeneze <i>in vitro</i> u kulturi segmenata lukovica	82
4.5.1.1. Kvantifikacija superoksid dismutaze	82
4.5.1.2. Kvantifikacija katalaza	89
4.5.1.3. Kvantifikacija peroksidaza	92
4.5.2. Kvantifikacija esteraza tokom indukcije morfogeneze <i>in vitro</i> u kulturi segmenata lukovica	98
4.5.3. Kvantifikacija AGP tokom indukcije morfogeneze <i>in vitro</i>	101
4.5.3.1. Koncentracija AGP tokom indukcije morfogeneze <i>in vitro</i> u kulturi bazalnih delova listova	102
4.5.3.2. Koncentracija AGP tokom indukcije morfogeneze <i>in vitro</i> u kulturi segmenata lukovica	103
4.5.3.3. Dokazivanje AGP ukrštenom elektroforezom tokom indukcije morfogeneze <i>in vitro</i>	104
5. DISKUSIJA	106
5.1. Regeneracija košutice <i>in vitro</i>	106

5.1.1. <i>In vitro</i> morfogeneza u kulturi zrelih zigotskih embriona <i>F. meleagris</i> L.	106
5.1.2. Indukcija morfogeneze <i>F. meleagris</i> L. kod lukovica formiranih <i>in vitro</i>	110
5.2. Prevazilaženje dormancije lukovica	114
5.3. Uloga antioksidativnih enzima u prevazilaženju dormancije lukovica	117
5.4. Biohemijski aspekti indukcije morfogeneze <i>in vitro</i> <i>F. meleagris</i>	124
5.4.1. Aktivnost antioksidativnih enzima i esteraza tokom indukcije morfogeneze <i>in vitro</i>	125
5.4.2. Sadržaj arabinogalaktanskih proteina tokom indukcije morfogeneze <i>in vitro</i>	130
6. ZAKLJUČCI	133
7. LITERATURA	136
8. BIOGRAFIJA AUTORA	176
PRILOG 1	
PRILOG 2	
PRILOG 3	

SKRAĆENICE

ABA	abscisinska kiselina
AGP	arabinogalaktanski proteini
APS	amonijum persulfat
APX	askorbat peroksidaza
BAP	6-benzilaminopurin
B5	Gamborg hranljiva podloga
BSA	bovin serum albumin
CAT	katalaze
CBB	komazi plavo boja
CH	kazein hidrolizat
DHAR	dehidroaskorbat reduktaza
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
2,4-D	2,4-dihlorofenoksi sirćetna kiselina
DTT	ditriotreitol
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
EB	24-epibrasinolid
EP2	lipid transfer protein
EP3	kisela endohitinaza
ER	Erikson hranljiva podloga
FA	Fast hranljiva podloga
FAA	formalin acetoacid etil alkohol
FAD	flavin adenin dinukleotid
GA ₃	giberelinska kiselina
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation
GSSG	glutation disulfid
H ₂ O ₂	vodonik peroksid
HPLC	tečna hromatografija pod visokim pritiskom
IAA	indol-3-sirćetna kiselina
IBA	indol-3-buterna kiselina
IEF	izoelektrično fokusiranje
KCN	kalijum cijanid
KIN	kinetin, 6-furfurilaminopurin
LS	Linsmaier i Skoog hranljiva podloga
MDA	monodehidroaskorbat
MDAR	monodehidroaskorbat reduktaza
MN	Motility – nitrat hranljiva podloga
MS	Murashige i Skoog podloga
NAA	α-naftil sirćetna kiselina
N6	Chu hranljiva podloga
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NBT	nitroblu tetrazolium hlorid

$^1\text{O}_2$	singlet kiseonik
$\text{O}_2^{\cdot-}$	superoksid anjon radikal
$\text{OH}\cdot$	hidroksil radikal
POX	peroksidaze
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PVPP	polivinilpirolidon
ROS	reaktivne kiseonične vrste
$\text{RO}_2\cdot$	peroksil radikal
SOD	superoksid dismutaza
TEMED	tetrametiletilendiamin
TDZ	tidiazuron
TRIS	tris (hidroksimetil) aminometan
ZEA	zeatin

1. UVOD

1.1. Morfogeneza biljaka u uslovima *in vitro*

Važna osobina biljaka koja ih bitno razlikuje od životinja jeste sposobnost vegetativnog razmnožavanja, tj. sposobnost izolovanih organa biljke da regenerišu čitavu biljku. Mogućnost vegetativnog razmnožavanja se široko koristi u praksi za razmnožavanje putem reznica, krtola i lukovica, kao i u kulturi tkiva gde početni eksplantati mogu biti mnogo manji delovi tkiva i organa, a broj dobijenih biljaka neuporedivo veći.

Permanentna kultura pupoljaka označena je kao mikropropagacija i zajedno sa organogenezom u kulturama kalusa predstavlja način vegetativne propagacije *in vitro*. Ostali morfogenetski putevi koji dovode do regeneracije cele biljke *in vitro* su somatska embriogeneza, androgeneza, ginogeneza i somatska hibridizacija (Debergh i Zimmerman, 1990). U daljem tekstu biće reči samo o dva načina vegetativnog razmnožavanja *in vitro* koji su korišćeni u ovom radu, tj. o organogenezi i somatskoj embriogenezi.

Mnoge endemične i ugrožene biljne vrste mogu se veoma uspešno umnožavati *in vitro* i na taj način se može sprečiti njihov nestanak (Mohammadi-Dehcheshmeh, 2007). Zakonom zaštićene biljne vrste mogu se umnožavati i reintrodukovati na svoja prirodna staništa bez ugrožavanja već postojećih populacija (Kizil i sar., 2008).

1.1.1. Organogeneza i somatska embriogeneza

Organogenezom se formiraju unipolarni organi *de novo*. Taj proces podrazumeva formiranje izdanaka i korenova za šta su potrebna dva indukciona signala, dok je za formiranje somatskog embriona potreban jedan indukcioni signal. Oba opisana morfogenetska puta vode ka formiranju cele biljke, ali se još uvek ne zna zašto neke ćelije formiraju somatske embrione, a neke podležu procesu organogeneze (Karami i sar., 2009). Organogeneza po načinu postanka može biti direktna i indirektna. Kod direktne organogeneze začeci novih organa obrazuju se od ćelija trajnih tkiva koje se dediferenciraju i organizuju kao meristemi. Kod indirektna organogeneze, dediferencirane ćelije se prvo dele obrazujući kalus, a zatim lokalizovani meristemski centri stiču strukturu apikalnog

meristema. Regulatori rastinja koji utiču na organogenezu su auksini i citokinini u određenom odnosu (Hofmann i sar., 2004). Ukoliko je odnos ova dva regulatora rastinja usmeren u korist auksina indukuje se formiranje korenova, dok visoka koncentracija citokinina u odnosu na auksine dovodi do formiranja izdanaka. Formiranju organa *de novo* prethode tri procesa: su sticanje kompetencije, determinacija i morfološka diferencijacija. Kalusne ćelije stiču kompetentnost za regeneraciju, ali nisu determinisane. Ukoliko se kalusi gaje na induktivnoj hranljivoj podlozi postaju determinisani za određeni morfogenetski put.

Somatska embriogeneza kao proces formiranja embriona iz somatskih ćelija, predstavlja vid umnožavanja biljaka za koji poslednjih godina postoji veliko interesovanje.

Kod viših biljaka, dvostruko oplođenje daje embrion i endosperm koji zajedno vode formiranju semena. Ta vrsta embriogeneze naziva se zigotska embriogeneza i dešava se unutar majke biljke (Dodeman i sar., 1997). Embriogeneza kod biljaka nije striktno ograničena na oplođenje jajne ćelije, već se može dešavati i u mnogim drugim ćelijama kao što su ćelije embrionove kesice (Slika 1). Mogućnost formiranja morfološki normalnog embriona, i kasnije cele biljke, od somatskih ćelija naziva se somatska embriogeneza (Zimmerman, 1993). Embrioni koji tom prilikom nastaju nazivaju se somatski embrioni. Formiranje somatskih embriona iz kalusa prvi put je opisano kod šargarepe (Steward i sar., 1958).



Slika 1. Različiti putevi razvića embriona kod viših biljaka (modifikovano prema Fehér i sar., 2005).

Od tada je proces somatske embriogeneze intenzivno proučavan kao metoda kojom se može regenerirati cela biljka *in vitro* i kao potencijalni model za izučavanje ranih morfoloških i fizioloških promena u biljnoj embriogenezi.

U svim oblicima biljne embriogeneze, pa samim tim i somatske embriogeneze, moraju biti zadovoljeni određeni kriterijumi pre nego što sam proces započne. Biljna vrsta mora imati genetski potencijal da formira embrione iz somatskih ćelija. Jedna ili više ćelija u biljci ili eksplantatu koji se koristi za indukciju somatske embriogeneze postaje kompetentna da primi određeni signal (endogeno ili egzogeno) koji bi služio kao okidač ka putu embriogenog razvića (Fehér, 2005). Somatska embriogeneza opisana je kod velikog broja vrsta i eksplantata na kojima je ispitivan uticaj različitih regulatora rasteња na ovaj proces. Međutim, i pored velikog broja informacija, još uvek nije rasvetljeno zašto određeni genotipovi imaju veći ili manji embriogeni potencijal, na koji način određene ćelije postaju kompetentne i koji signal služi kao okidač za početak procesa somatske embriogeneze (Zavattieri i sar., 2010).

Kompetentne ćelije su one ćelije koje su sposobne da prime signal za dediferencijaciju i postaju ćelije koje će dati somatske embrione (Halperin, 1969). Ove dediferencirane ćelije potiču od meristemskih ili embriogenih ćelija, a mogu nastati i od ćelija koje su tretirane različitim regulatorima rasteња ili pojedinim stresnim faktorima (Kamada i sar., 1993; Nishiwaki i sar., 2000; Pasternak i sar., 2002; Ikeda-Iwai i sar., 2003). Visoke koncentracije 2,4-dihlorofenoksi sirćetne kiseline (2,4-D, 100 μ M) ili nekog drugog sintetičkog auksina primenjene u kratkom periodu od nekoliko minuta pre početka gajenja eksplantata na hranljivoj podlozi bez regulatora rasteња, dovode do formiranja somatskog embriona (Dudits i sar., 1991). Ovo zapažanje dokazuje da ćelije stiču kompetentnost u prisustvu auksina i da se dalji proces somatske embriogeneze može odvijati i bez auksina u hranljivoj podlozi (Šamaj i sar., 2003; Fehér i sar., 2003). Auksini su bitni za uspostavljanje auksinskog gradijenta tokom indukcione faze somatske embriogeneze, odnosno za uspostavljanje bilateralne simetrije tokom formiranja embriona (Zimmerman, 1993). U više od 65% protokola 2,4-D sam ili u kombinaciji s drugim regulatorima rasteња dovodi do indukcije somatske embriogeneze i najverovatnije je

uključen u seriju reakcija koje učestvuju u metilaciji DNK, koja služi kao okidač za početak ovog procesa (Karami i Saidi, 2010).

Prisustvo stresnih faktora, poput jona gvožđa, bakra, azotnih oksida (Pasternak i sar., 2002; Ötvös i sar., 2005) ili osmotski stres izazvan saharozom ili natrijum-hloridom (Wetherell, 1984; Kamada i sar., 1989) takođe dovode do povećanja kompetentnosti ćelija u odsustvu regulatora rasteinja. Različite vrste stresa dovode do sinteze povećane koncentracije abscisinske kiseline (ABA). ABA koja se sintetiše u uslovima stresa kod biljaka, može indukovati somatsku embriogenezu (Nishiwaki i sar., 2000), kao što je pokazano kod duvana (Senger i sar., 2001) i suncokreta (Charrière i sar., 1999). Smatra se da kalcijum ima ulogu posrednika koji je uključen u signalnu transdukciju ABA, a samim tim i u proces somatske embriogeneze (Karami i Saidi, 2010).

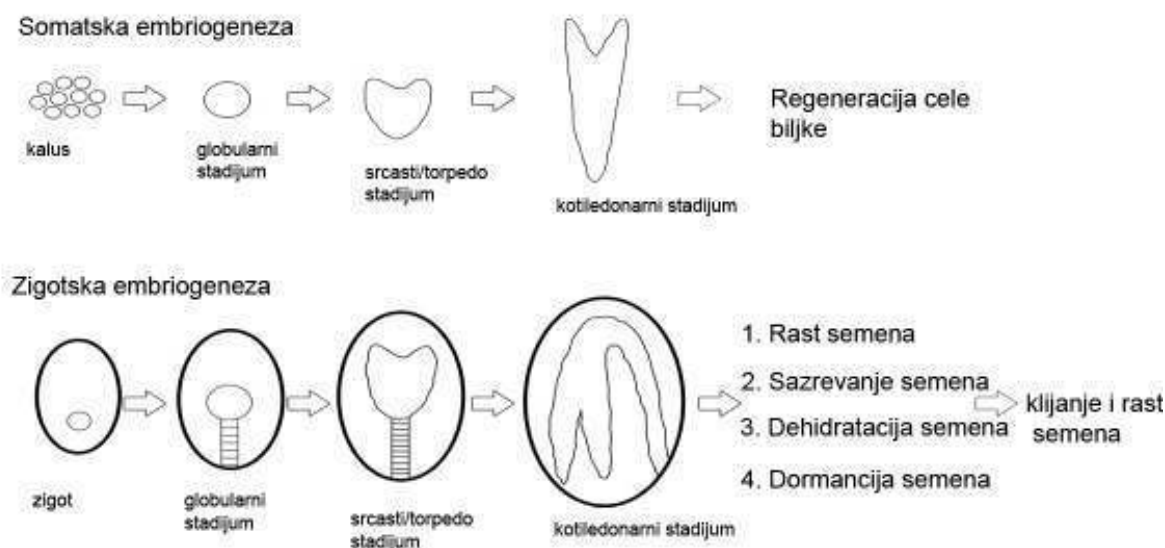
Potencijal biljne ćelije za somatsku embriogenezu je na prvom mestu određen genotipom (Bowley i sar., 1993; Moltrasio i sar., 2004). Obično je ograničen na određena biljna tkiva u okviru datog genotipa. Embriogeni potencijal je veći u tkivima koja su embriogenog porekla kao što su nezreli embrioni, semena kao i osnove lista monokotila, a opada ka hipokotilu, listovima i korenu (Neumann, 2000). Embriogene ćelije se razvijaju u somatske embrione spontano bez spoljašnjih stimulusa ili uz veoma malu koncentraciju auksina, za razliku od ćelija koje su tu sposobnost izgubile i koje moraju biti indukovane da bi ušle u proces somatske embriogeneze (Sharp i sar., 1980). Tokom ontogenetskog razvića biljaka, embriogeni potencijal takođe opada (Fehér i sar., 2003). Embriogeni potencijal meristemskih ćelija u eksplantatu može se zadržati ukoliko se eksplantati gaje na hranljivoj podlozi koja sadrži 2,4-D. U većini slučajeva se na tim eksplantatima formira kalus, pa se somatski embrioni formiraju posle daljeg gajenja na hranljivoj podlozi sa nižom koncentracijom auksina ili na hranljivoj podlozi bez regulatora rasteinja. Takav način formiranja somatskih embriona, uz kalusnu interfazu, naziva se indirektna somatska embriogeneza, za razliku od direktne gde se somatski embrioni formiraju direktno na eksplantatu bez kalusne interfaze (Fehér i sar., 2005). Somatski embrioni mogu poticati od jedne ili više ćelija. Kada somatski embrion nastaje od embriogenog tkiva u njegovom formiranju obično učestvuje više susednih ćelija. Smatra se da tokom indukovane somatske embriogeneze embrioni nastaju po pravilu od jedne ćelije kao i zigotski embrioni (Haccius,

1978). Bez obzira da li su somatski embrioni nastali od jedne ili više ćelija, somatska embriogeneza može biti direktna ili indirektna. Somatski embrioni su vezani za matični eksplantat svojim bazalnim delom, što je u slučaju somatske embriogeneze poreklom od jedne ćelije, struktura nalik suspenzoru (Faure i sar., 1996; Quiroy-Figueroa i sar., 2002).

Embriogene ćelije su veoma slične meristemskim ćelijama. Imaju visok indeks umnožavanja, izodijametričnog su oblika, sa gustom citoplazmom, velikim jedrom, malim vakuolama i tankim ćelijskim zidovima (Halperin i Jensen, 1967; Williams i Maheswaran, 1986).

Razlozi zbog kojih se embriogeni potencijal gubi ili vremenom smanjuje nisu poznati. Smatra se da je jedan od činilaca koji utiču na embriogeni potencijal sinteza i metabolizam endogenih regulatora rastenja kao što je auksin (Chuck i Hake, 2005).

Razviće somatskog embriona je veoma slično razviću zigotskog embriona u pogledu morfologije, kao i u pogledu vremenski određenih faza kroz koje somatski embrion prolazi tokom svog razvića (Zimmerman, 1993) (Slika 2). U oba slučaja embriogeneze, jedna ćelija (zigot ili somatska ćelija) se razvija u embrion koji predstavlja novu individuu s promenjenim (zigot) ili istim genomom (somatski embrion).



Slika 2. Poređenje između somatske i zigotske embriogeneze (modifikovano prema Zimmermanu, 1993).

Prvi prepoznatljivi stadijum u razviću embriona je globularni stadijum. Prva deoba ćelija ne mora biti inekvalna, kao u slučaju zigotske embriogeneze, ali se posle nekoliko deoba obrazuje globula koja može obrazovati globularni embrion ili proembrionalnu masu (Haccius, 1978). Tokom globularnog stadijuma se formira protoderm (Quiroz-Figueroa i sar., 2006). Deobe ćelija protoderma su antikline i prate unutrašnje deobe ćelija formirajući sloj budućeg epidermisa (West i Harada, 1993). Posle dva-tri dana tokom kojih globularni embrion raste izodijametrično, dolazi do prelaza na rasteenje kojim se formira bilateralna simetrija embriona i taj stadijum se zove srcasti (Schiavone i Cooke, 1985). Tokom prelaza sa globularnog na srcasti stadijum dolazi do početka rasta kotiledona, izduživanja hipokotila i formiranja radikule, što se nastavlja i tokom narednog torpedo-stadijuma. Prokambijum se takođe razvija tokom srcastog stadijuma (Schiavone i Cooke, 1985). Posle tri nedelje, u slučaju somatske embriogeneze šargarepe, formirana biljčica ima razvijene zelene kotiledone, hipokotil i koren (Halperin i Wetherell, 1964). Somatski embrioni vrlo rano uspostavljaju bipolarnost i korenski kraj je „zatvoren“ meristemom, tako da nema vaskularne veze sa matičnom biljkom ili eksplantatom (Subotić i sar., 2010). Za razliku od zigotskog embriona, kod somatskog embriona se ne razvijaju endosperm i suspenzor (Dodeman i sar., 1997). Biljčice, nastale od somatskog embriona, nastavljaju da rastu u potpuno razvijenu biljku, za razliku od zigotskog embriona koji posle torpedo stadijuma razvijaju kotiledone i dolazi do dehidracije i pripreme za dormanciju koje kompletiraju proces formiranja semena. Opisani procesi su pod uticajem abscisinske kiseline, tj. njene povećane koncentracije (Thomas, 1993). Česta je pojava da se na već formiranom, primarnom embrionu, razvijaju sekundarni embrioni što se zove sekundarna embriogeneza (Quiroz-Figueroa i sar., 2006).

Visoka koncentracija regulatora rasteenja koja je potrebna za indukciju somatske embriogeneze, može biti potencijalni uzrok poremećaja u organizaciji ili potpunom odsustvu apikalnog meristema (Goebel-Tourand i sar., 1993). Meristem korena se takođe drugačije razvija kod somatskog embriona, a moguće su i abnormalnosti u samom razviću korena. Kao što je naglašeno, somatski embrioni nemaju suspenzor i njegov nedostatak se ogleda u problemima vezanim za razviće meristema korena i samog korena (Dodeman i sar., 1997). Međutim, i pored morfoloških nedostataka, somatski embrioni u većini

slučajeva normalno klijaju i razvijaju se u biljku (Gaj, 2001). Somatska embriogeneza se koristi za umnožavanje komercijalno poželjnih vrsta i sorti (Merkle i sar., 1990) i ima niz prednosti u odnosu na organogenezu (Jiménez 2001):

1. Somatska embriogeneza pokazuje veći morfogenetski potencijal tj. može se formirati veći broj regeneranata.

2. Somatski embrioni su od samog početka bipolarni, pa nije potreban poseban sistem za ožiljavanje kao kod regenerisanih pupoljaka.

3. Somatski embrioni su najčešće jednoćelijskog porekla tako da je moguće dobiti sinhronizovane kulture embriona koji su na istom stadijumu razvića.

4. Biljke nastale od somatskih embriona su manje genetički varijabilne od onih koje su nastale putem organogeneze.

1.1.2. Biohemijski aspekti somatske embriogeneze

Molekularna osnova procesa somatske embriogeneze, odnosno prelazak somatskih ćelija u embriogene, još uvek nije dovoljno rasvetljena (Fehér i sar., 2003). Saznanja o biohemijskim markerima somatske embriogeneze rasvetlili bi mehanizam sticanja embriogenog potencijala biljnih ćelija, što bi pružilo dodatne informacije o molekularnim mehanizmima procesa diferencijacije biljnih ćelija. Različiti eksperimentalni pristupi korišćeni su za izolaciju i karakterizaciju markera somatske embriogeneze. U većini slučajeva rađena je analiza ukupnih proteina iz embriogenih i neembriogenih ćelija, pa je njihovim upoređivanjem dobijena delimična slika proteina koji su uključeni samo u proces somatske embriogeneze (Tchorbadjieva, 2005). Na taj način dobija se ogroman broj različitih proteina koji se ne mogu svi nazvati markerima somatske embriogeneze (Hahne i sar., 1988; Hilbert i sar., 1992). Biohemijski aspekti somatske embriogeneze istraživani su na mnogim vrstama, a prva istraživanja rađena su na šargarepi (Sung i Okimoto, 1981) gde je pokazano prisustvo dva specifična proteina od 77 i 43 kD. Tokom indukcije somatske embriogeneze, i tokom samog procesa, dešavaju se specifične promene u pogledu sadržaja ukupnih proteina. Određeni proteini i njihove izoforme se sintetišu i mogu se detektovati, dok neke druge nestaju (Tchorbadjieva, 2005).

Kao potencijalni, dobri markeri somatske embriogeneze označeni su ekstracelularni proteini koji su neophodni za diferencijaciju biljnih ćelija. Njihov broj je mnogo manji od ukupnog broja izolovanih proteina koji se mogu detektovati tokom samog procesa somatske embriogeneze (Sterk i sar., 1991; De Jong i sar., 1992; Kreuger i Van Holst, 1993; Domon i sar., 2000) i najbolje se mogu izučavati u ćelijskim suspenzijama kod kojih se nagomilavaju u hranljivoj podlozi. Najvećim delom, ovi ekstracelularni proteini predstavljaju derivate ćelijskog zida koji ostaju u apoplastu, ili hranljivoj podlozi i na taj način utiču na rast i razviće svih ćelija u suspenziji (Mordhorst i sar., 1997).

Pokazano je da EP2 („lipid-transfer“ protein), EP3 („acidic endochitinase“) i peroksidaze igraju ključnu ulogu u procesu somatske embriogeneze šargarepe (Cordewener i sar., 1991; Sterk i sar., 1991; De Jong i sar., 1995). Svi ovi proteini detektovani su tokom najranijih stadijuma somatske embriogeneze i mogu služiti kao rani markeri embriogenog potencijala (Tchorbadijeva, 2005). Esqueda i sar. (1998) dokazali su prisustvo polipeptida od 34 i 36 kD u embriogenoj suspenziji šećerne repe i potvrdili učešće ovih polipeptida u njenom embriogenom razviću. Ekstracelularni protein povezan sa embriogenim kapacitetom ovasa ima molekulsku masu od 46 kD (Stirn i sar., 1995). Ekstracelularni proteini nalik germinima izolovani su iz embriogenih ćelija bora (Domon i sar., 1995). Oni su već dokazani kao markeri embriogenog potencijala žitarica (Lane i sar., 1993). Normalno razviće somatskih embriona povezano je sa prisustvom ovih ekstracelularnih proteina u okolnoj hranljivoj podlozi, za razliku od somatskih embriona koji su prekinuli razviće posle nekog vremena i u čijoj okolini ovi proteini nisu nađeni (Mo i sar., 1996). Ekstracelularni proteini, označeni kao kisele esteraze, detektovani su u suspenziji ćelija *Dactylis glomerata*, i oni su specifični za embriogene ćelije koje imaju potencijal da regenerišu celu biljku dok odsustvuju iz suspenzije neembriogenih ćelija (Tchorbadijeva i Odjakova, 2001). Od svih analiziranih esteraza u ovom slučaju izdvaja se kisela izoforma molekulske težine 36 kD koja se pojavljuje u svim ispitivanim linijama embriogenih ćelija.

EP2 se javlja u embriogenim ćelijama somatskih i zigotskih embriona šargarepe (Sterk i sar., 1991) i pripada familiji proteina, specifičnih za biljke, koji utiču na distribuciju fosfolipida ćelijskih membrana i imaju mogućnost da vezuju masne kiseline uključujući i kutikularne komponente koje su specifične samo za embriogene ćelije, dok se ne mogu naći

u već zrelim somatskim embrionima (Karami i sar., 2009). Ove kutikularne komponente su veoma lipofilne supstance koje obavijaju embriogene ćelije i na taj način ih ograničavaju od uticaja okolnih neembriogenih ćelija praveći fiziološku barijeru (Pedroso i Pais 1995). Pojačana ekspresija gena za „lipid transfer“ proteine karakteristična je za rane faze somatske embriogeneze (Sterk i sar., 1991).

Jedan od važnih ekstracelularnih proteina koji ima pozitivan uticaj na somatsku embriogenezu šargarepe je kisela endohitinaza obeležena kao hitinaza IV (De Jong i sar., 1992). Hitinaze hidrolizuju β -1,4 glikozidne veze hitina, koji je polimer N-acetil-D-glukozamina. Javljaju se kod mnogih biljaka i primarno imaju ulogu u odbrani biljaka od patogenih gljiva i drugih vrsta stresa (Kasprzewska, 2003). U ćelijskoj suspenziji *D. glomerata* endohitinaza, molekulske mase 32 kD, pospešuje razviće somatskih embriona i detektovana je u svim fazama somatske embriogeneze (Tchorbadijeva i Pantchev, 2006).

1.1.2.1. Arabinogalaktanski proteini (AGP)

Arabinogalaktanski proteini spadaju u grupu biljnih glikoproteina koji po strukturi najviše odgovaraju životinjskim proteoglikanima. AGP su pronađeni kod svih biljaka, kao i kod jednoćelijskih algi, a spadaju u grupu proteina veoma bogatih hidroksiprolinom i mogu se naći u biljnim gumama koje su komercijalno vrlo interesantne. Jedna od najtraženijih je gumiarabika poreklom iz *Acacia senegal*, koja se koristi u industriji hrane (Showalter, 2001). Molekulska masa AGP je između 60 i 300 kD (Majewska i Nothnagel, 2000). AGP su izolovani iz listova, stabla, korena, cvetnih delova i semena i nalaze se na površini biljne ćelije, u ćelijskom zidu i plazma membrani, a imaju važnu ulogu u rastenju i razviću biljaka, dok je njihovo prisustvo veoma izraženo u ćelijskim suspenzijama (Nothangel, 1997; Fincher i sar., 1983). Postoji specifičnost u distribuciji različitih familija AGP u različitim organima i tkivima (Showalter, 2001). Arabinogalaktanski proteini spadaju u važnu grupu ekstracelularnih proteina uključenih u proliferaciju i rasteenje ćelija kao i indukciju somatske embriogeneze i razviće somatskih embriona (Showalter, 2001). Egzogeno dodati arabinogalaktanski proteini mogu delovati pozitivno na somatsku embriogenezu šargarepe (Kreuger i Van Holst, 1993; Toonen i sar., 1997).

Za proteinski deo AGP vezani su arabinozni i galaktozni polisaharidi i to najčešće preko kiseonika na hidrokisprolinu (Gaspar i sar., 2001). Broj saharidnih jedinica veoma varira, od slabo do visoko glikolizovanih AGP (Seifert i Roberts, 2007). Polisaharidni lanci broje 30-150 jedinica i mogu biti vezani na različitim mestima za proteinski lanac. U odnosu na polisaharidni deo AGP se dele na tip I i tip II. Tip I AGP sadrži galaktanski lanac u kome je galaktoza povezana β -(1→4) glikozidnim vezama. AGP ovog tipa mogu biti povezani sa ostalim polisaharidima kao što su pektini ili pojedini saharidi ćelijskog zida. Tip II AGP sadrži galaktanski lanac sa β -(1→3) glikozidnim vezama i nisu povezani sa drugim molekulima kao što je tip I AGP. Polisaharidni lanac se može granati i biti supstituisan sa ramnozom, manozom, ksilozom, fukozom ili glukozaminom. Ovi spoljašnji lanci ugljenih hidrata vezani su za osnovni β -(1→6) glikozidnim vezama (Hinz i sar., 2005). AGP imaju transmembranski domen koji je supstituisan glikozil fosfatidil inozitolom i smatra se da ovaj domen ima važnu ulogu u međućelijskim interakcijama (Filmus i sar., 2008; Lim i sar., 2008; Showalter i sar., 2010). Veoma velika raznovrsnost AGP proističe iz načina na koji su vezani arabinozni i galaktozni polisaharidi, dužine polisaharidnog lanca kao i od same strukture njihovog proteinskog lanca (Ellis i sar., 2010).

Tabela 1. Vrste kod kojih je dokazan uticaj arabinogalaktanskih proteina na indukciju somatske embriogeneze

Vrsta	Referenca
<i>Cichorium hybrid 474</i>	Chapman i sar., 2000.
<i>Cyclamen persicum</i>	Kreuger i sar., 1995.
<i>Dactylis glomerata</i>	Zagorchev i sar., 2008. Stacey i sar., 1990.
<i>Daucus carota</i>	Kreuger i Van Holst, 1993. Tonnen i sar., 1996.
<i>Picea abies</i>	Egertsdotter i Van Arnold, 1995.
<i>Pinus caribea</i>	Mollard i sar., 1997. Domon i sar., 2000.
<i>Zea mays</i>	Šamaj i sar., 1998

Na ugljenohidratni deo AGP otpada veliki deo molekula. Proteinski deo čini 2-10 % kod najvećeg broja AGP, iako je kod nekih konstatovan visok nivo proteina od 30-65 % (Baldwin i sar., 1993).

Na osnovu sastava proteinskog dela molekula, AGP se mogu podeliti na klasične i neklasične (Mau i sar., 1995). Klasični AGP imaju proteinski deo bogat hidroksiprolinom, alaninom, serinom, treoninom i glicinom. Neklasični su siromašni hidroksiprolinom, ali zato u svom sastavu sadrže dosta cisteina i asparagina (Mau i sar., 1995; Du i sar., 1996). Prema dve različite pretpostavke, AGP mogu biti globularnog ili končastog oblika.

AGP su uključeni u brojne aspekte rasteanja i razvića biljaka, mada njihova biološka uloga još uvek nije dovoljno rasvetljena, kao ni mehanizmi delovanja na molekularnom nivou. Postoje dokazi da učestvuju u formiranju ćelijskog zida (Schindler i sar., 1995), programiranoj ćelijskoj smrti (Gao i Showalter, 1999; Mashiguchi i sar., 2008), deobi ćelija (Serpe i Nothangel, 1994; Coskun i sar., 2010), rastu polenove cevi (Jauh i sar., 1996; Roy i sar., 1998; Lee i sar., 2008), diferencijaciji ćelija (Pennel i Roberts, 1990), formiranju polena (Coimbra i sar., 2009), deobi zigota (Qin i Zhao, 2006), androgenezi (Tang i sar., 2006), sazrevanju kotiledona (Zhong i sar., 2011) i somatskoj embriogenezi (Egertsdotter i Van Arnold, 1995; Kreuger i Van Holst, 1995; Wu i sar., 2000; Pan i sar., 2011).

Tokom somatske embriogeneze, različiti AGP mogu biti aktivni u različitim stadijumima razvića (Kreuger i van Holst, 1995; Toonen i sar., 1997) i mogu se naći u hranljivoj podlozi na kojoj je indukovana somatska embriogeneza (Chapman i sar., 2000). Monoklonalna antitela, koja reaguju sa polisaharidnim delovima AGP, su veoma korisna za izučavanje organizacije i dinamike interakcija između komponenti ćelijskog zida i delova središnje lamele (Knox, 1997; Willats i sar., 2000). Međutim, većina pomenutih antitela reaguje sa ugljenim hidratima koji mogu biti vezani za različite proteinske delove AGP kao i za druge molekule kao što su pektini. Epitopi AGP koji se nalaze na površini ćelija suspenzije šargarepe reaguju sa JIM8 antitelom što je dokaz da su ovi proteini markeri veoma ranog stadijuma somatske embriogeneze neposredno posle indukcije (Pennel i sar., 1992). Koncentracija AGP tokom različitih stadijuma somatske embriogeneze takođe varira što je pokazano kod norveške jele gde su se sastav i koncentracija AGP razlikovali u slučaju dva tipa somatskih embriona, od kojih su jedni imali veći embriogeni potencijal od

drugih (Egertsdotter i Van Arnold, 1995). AGP iz hranljive podloge na kojoj je indukovana somatska embriogeneza mogu pospešiti formiranje somatskih embriona (Egertsdotter i Van Arnold, 1995; Tchorbadijeva, 2005).

Smatra se da su AGP proteini veoma važni za međucelijsku komunikaciju (Schulz i sar., 1998). Komunikacija se verovatno bazira na interakciji AGP sa pektinskim molekulima ćelijskog zida i to preko jonskih veza (Serpe i sar., 1995; Ovečka i Bobák M, 1999). AGP mogu reagovati međusobno i te interakcije su slične onima koje imaju sa pektinom (Kjellbom i sar., 1997). Polisaharidni deo AGP može biti enzimski odvojen od proteinskog dela i na taj način učestvovati u morfogogenetskim procesu kao signalni molekul (Kawaguchi i sar., 1996). Postoje pretpostavke da polisaharidni deo AGP i endohitinaze zajedno učestvuju u procesu somatske embriogeneze. Pod uticajem hitinaza, oslobađa se ugljenohidratni deo molekula AGP koji reaguje sa receptorima na plazma membrani indukujući na taj način somatsku embriogenezu (Van Hengel, 2002; Tchorbadijeva, 2005). Proteinski deo, takođe može učestvovati u međucelijskoj komunikaciji, ali prvo mora biti odvojen deglikolizacijom (Showalter, 2001).

AGP mogu direktno ili indirektno reagovati s receptorima na plazma membrani. Mogu se vezivati direktno na različitim mestima na plazma membrani, a u slučaju indirektnog vezivanja posreduje ligand-receptor (Peles i sar., 1997).

AGP se vezuju i precipitiraju sa Yariv reagensom (Yariv i sar., 1962, 1967). Yariv reagens je trovalentna fenilglikozidna tamnocrvena boja (1,3,5-tris(4- β -glukopiranozil oksifenilazo) 2,4,6-trihidrobenzen ili skraćeno β -D-glukozil Yariv. Kako je familija AGP veoma brojna i različitog aminokiselinskog i ugljenohidratnog sastava, ne može se generalno reći da svi AGP reaguju sa pomenutim reagensom (Showalter, 2001). Yariv reagens može ući u ćelijski zid, ali ne i u plazma membranu. Tačan način vezivanja AGP za Yariv reagens se ne zna (Gao i Showalter, 1999; Pettolino i sar., 2006). Precipitacija AGP Yariv reagensom se koristi za određivanje njihove koncentracije, izolaciju i prečišćavanje (Van Holst i Clarke, 1985). Dodavanjem Yariv reagensa u suspenziju ćelija ili hranljivu podlogu mogu se inaktivirati AGP pa samim tim i njihova uloga, te se na posredan način može izučavati biološka funkcija AGP (Serpe i Nothangel, 1994; Willats i Knox, 1996; Thompson i Knox, 1998).

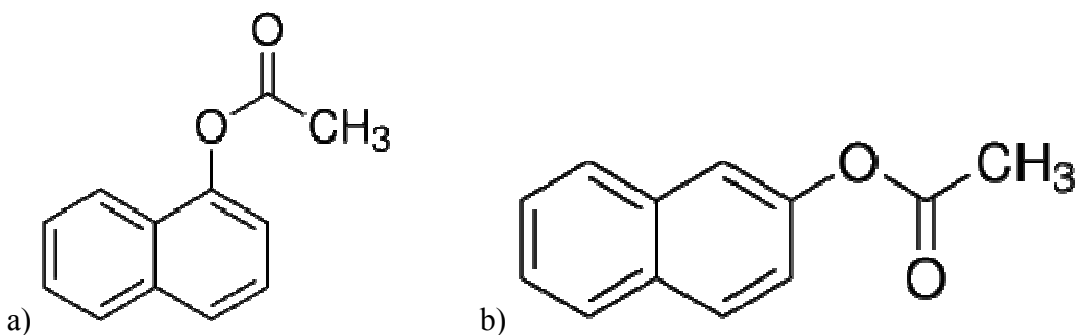
1.1.2.2. Opšte odlike esteraza

Esteraze spadaju u grupu hidrolitičkih enzima koji katalizuju reakciju cepanja estara na kiselinu i alkohol u hemijskoj reakciji hidrolize u kojoj učestvuje voda. Postoji veliki broj esteraza koje se razlikuju po supstratnoj specifičnosti, proteinskoj strukturi i njihovoj biološkoj funkciji. Najčešća podela esteraza bazira se na njihovoj osetljivosti na tačno određene koncentracije tri grupe inhibitora (sulfhidril reagens, organofosfate i eserin sulfate) (Holmes i Masters, 1967). Korišćenjem ovih inhibitora izdvajaju se četiri klase biljnih esteraza:

1. Acetilesteraze (nisu osetljive ni na jedan inhibitor)
2. Arilesteraze (osetljive jedino na sulfhidril reagens)
3. Karboksilesteraze (inhibirane organofosfatima)
4. Holinesteraze (inhibirane organofosfatima i eserin sulfatom).

Acetilesteraze su generalno specifične za alifatične supstrate uključujući estre sirćetne kiseline. Specifičnost arilesteraza se ograničava na aromatične estre, dok su karboksilesteraze takođe specifične za alifatične supstrate, ali s dužim lancima i na kraju holinesteraze koje su specifične za holin estre (De Carvalho i sar., 2003).

Najviše podataka o ulozi esteraza u fiziološkim procesima ima kod životinja i mikroorganizama, dok su podaci kod biljaka veoma oskudni (De Carvalho i sar., 2003). Najčešće izučavane esteraze kod biljaka su aril i karboksilesteraze koje mogu biti detektovane prema protokolu uspostavljenom od strane Burlina i Galzigna (1972) i koji je baziran na supstratnoj specifičnosti esteraza prema 1 i 2-naftil acetatu (Slika 3). Iako arilesteraze i karboksilesteraze imaju različite katalitičke centre, ukoliko im se kao supstrat ponudi naftil acetat, davaće isti proizvod „napadajući“ estarsku vezu samo s različitih strana.



Slika 3. Hemijska struktura a) 1-naftil acetata i b) 2-naftil acetata

Različite izoforme aril i karboksilesteraza ispoljavaju različit afinitet prema 1- i 2-naftil acetatu. Ova različitost se ogleda u brzini katalize reakcije razlaganja supstrata, a posledica je finih razlika u katalitičkim centrima različitih izoformi. Proizvodi reakcije su u oba slučaja isti tj. naftil i acetat. Razlika je samo u afinitetu enzima za određeno mesto na supstratu, tj. da li će enzim „napasti“ supstrat sa strane aromatičnog prstena (arilesteraze) ili sa acetatne strane (karboksilesteraze).

Esteraze pokazuju pojačanu aktivnost tokom somatske i zigotske embriogeneze (Egertsdotter, 1998). Njihova uloga u procesu somatske embriogeneze može se pripisati razlaganju pektina, procesom demetilacije i deacetilizacije, koji je sastavni deo ćelijskog zida. Na taj način esteraze indirektno pomažu proces proliferacije ćelija (Van Engelen i De Vries, 1993). Reakcija razlaganja ćelijskog zida aktivnošću esteraza utiče na pH apoplasta što indirektno utiče na regulaciju aktivnosti drugih enzima koji učestvuju u razlaganju ćelijskog zida (Micheli, 2001). Prilikom razlaganja ćelijskog zida povećava se broj mesta za koja se može vezati aluminijum i na taj način se povećava njegova koncentracija u ćeliji (Tamas i sar., 2005). Za razliku od pomenutih esteraza koje razlažu ćelijski zid, acetilesteraze imaju važnu ulogu u modifikacijama i rasteњу ćelijskog zida (Bordenave i sar., 1995). Učestvuju i u razlaganju različitih ksenobiotika u biljnim ćelijama i na taj način sprečavaju mogućnost toksikacije prevelikim količinama ovih supstanci (Sandermann, 1992; Cummins i sar., 2001).

Esteraze imaju pojačanu aktivnost i tokom regeneracije procesom organogeneze kao što je pokazano kod *Mammillaria gracillis* (Balen i sar., 2003). Veći broj izoformi

esteraza u embriogenom kalusu ove vrste u odnosu na izdanke govori u prilog hipotezi da različite izoforme esteraza učestvuju u morfogenetskom procesu. Slični rezultati koji govore da se izoforme esteraza razlikuju u kalusu i regenerisanim izdancima pokazani su kod indijske bokvice (Pramanik i sar., 1996). Kod vrsta iz ovog roda esteraze mogu služiti i kao biohemijski marker za identifikaciju vrsta (Pramanik i sar., 1994).

Nezanemarljiva uloga esteraza koje funkcionišu kao bioindikator prisustva toksičnih supstanci kao što su insekticidi dokazana je kod *Aspidosperma polyneuron* (De Carvalho i sar., 2003). Teški metali koji se nagomilavaju u biljnim ćelijama uzrokuju pojačanu aktivnost esteraza, što je i pokazano u slučaju ćelija duvana koje su tretirane kadmijumom (Viteček i sar., 2007).

Coppens i Dewitte (1990) su pokazali da su različite izoforme esteraza veoma specifične za indukciju somatskih embriona u kalusu ječma pre nego što su somatski embrioni formirani. Dve izoforme esteraza potvrđene su u embriogenom tkivu šargarepe (Chibbar i sar., 1988). Esteraze učestvuju u procesu regeneracije kod nekih žitarica (Rao i sar., 1990; Bapat i sar., 1992). Uključene su u proces organogeneze, kao i u proces transformacije biljnih tkiva Ti plazmidom (Balen i sar., 2003).

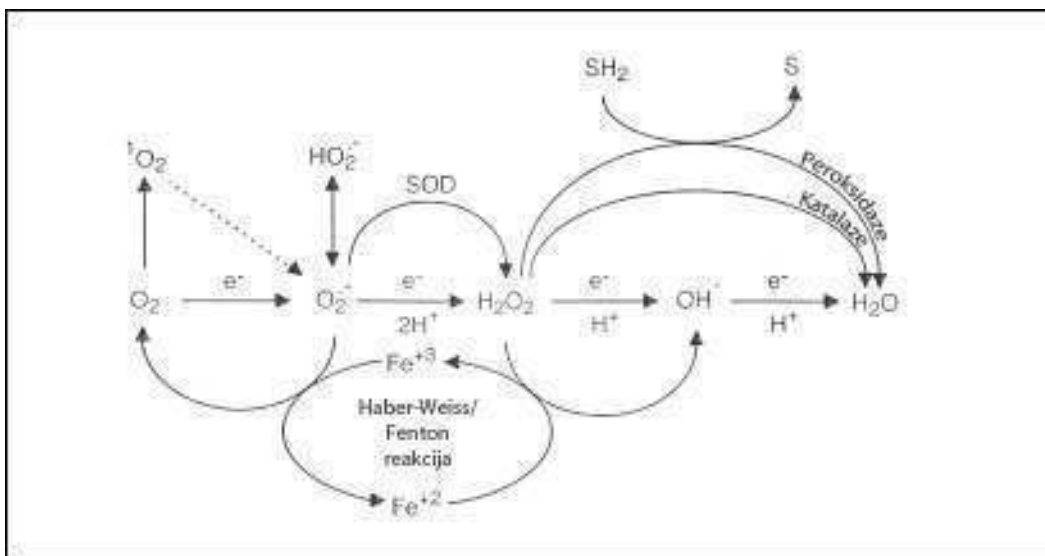
Esteraze izolovane iz suspenzije ćelija *Dactylis glomerata* jasno ukazuju da li se radi o embriogenom ili neembriogenom tkivu (Tchorbadijeva i Odjakova, 2001). Posle izoelektričnog fokusiranja utvrđeno je prisustvo esteraze pI vrednosti 3,8 koja se javlja u svim stadijumima somatske embriogeneze. U kontrolnim neembriogenim linijama enzim nije prisutan. Molekulska masa ove specifične esteraze iznosi 36 kD i prisutna je u embriogenom tkivu u najranijim stadijumima somatske embriogeneze kada morfološke promene još nisu uočljive (Tchorbadijeva, 2005).

1.2. Oksidativni stres kod biljaka

Činioci koji nepovoljno utiču na rastenje i razviće biljaka, smajujući im produktivnost na nivo niži od njihovog genetičkog potencijala predstavljaju stres (Bowler i sar., 1994). Svi tipovi stresa dovode do oslobađanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i tako dovode do oksidativnog stresa (Inze i Montagu, 2002). Biljke su neprestano izložene

abiotičkom i biotičkom stresu i tokom evolucije su razvile brojne mehanizme adaptacije, aklimatizacije i tolerancije. Abiotički stres predstavlja višak ili manjak nekog činioca u fizičkom ili hemijskom okruženju biljke. Mogu ga izazvati visoke i niske temperature, suša, visoke koncentracije soli u zemljištu, osmotski stres, jonizujuće zračenje, mehanički stres, manjak hranljivih materija, herbicidi i prisustvo zagađivača u zemljištu i vazduhu (teški metali, SO₂, ozon). Biotički stres izazivaju korovi, štetočine (insekti, ptice, glodari, nematode) i različiti patogeni (bakterije, virusi, gljive).

Biljke poseduju veoma efikasan antioksidativni sistem koji omogućava uklanjanje ROS i zaštitu biljne ćelije od oštećenja izazvanog oksidativnim stresom (Halliwell i Gutteridge, 1989). Biljkama, kao aerobnim organizmima, potreban je kiseonik za efikasnu proizvodnju energije tj. za disanje. Molekulski kiseonik nije reaktivan u svom osnovnom stanju već samo u pobuđenom, tj. aktiviranom. Tokom redukcije kiseonika do vode, nastaju ROS u koje se svrstavaju superoksid anjon radikal (O₂^{·-}), hidroksil radikal (OH[·]), peroksil radikal (RO₂[·]), vodonik peroksid (H₂O₂), singlet kiseonik (¹O₂) (Slika 4). Pored slobodnih radikala kiseonika, stvaraju se još i radikali ugljenika, tiol radikali i ostali. Formiranje ROS nastaje u procesu postepene redukcije kiseonika. Superoksid anjon radikal je umereno reaktivan ROS, koji može proći kroz biološke membrane. Najčešće dovodi do formiranja H₂O₂ i O₂ u reakciji koja se može desiti spontano, ali je uglavnom katalizuje enzim superoksid dismutaza. Ovaj reaktivni superoksidni anjon može izazvati tranziciju metalnih kompleksa Fe³⁺ i Cu²⁺ te samim tim utiče na aktivnost metaloenzima. Najveća oštećenja ćelija izazivaju ROS koji se kasnije formiraju, a to su vodonik peroksid i hidroksil radikal (Halliwell i Gutteridge, 1989). Vodonik peroksid može inaktivirati enzime oksidacijom njihovih tio-grupa, a odgovoran je i za inaktivaciju enzima Kalvinovog ciklusa (Charles i Halliwell, 1980), Cu-Zn i Fe superoksid dismutaze. Najreaktivniji ROS je hidroksil radikal koji nastaje od vodonik peroksida u tzv. Haber-Weissovoj ili Fentonovoj reakciji, uz prisustvo slobodnog ili heliranog gvožđa. Hidroksil radikal može reagovati sa svim biološkim molekulima i ćelije nemaju efikasan enzimski mehanizam da eliminišu ovaj visoko reaktivni ROS. Njegova akumulacija dovodi do lipidne peroksidacije, denaturacije proteina i mutacije DNK što neminovno izaziva smrt ćelije (Vranova i sar., 2002).



Slika 4. Formiranje ROS dobijenih postepenom redukcijom kiseonika i antioksidativni enzimi koji učestvuju u njihovom uklanjanju (modifikovano prema Vranova i sar., 2002) SOD – superoksid dismutaza.

ROS reaguju sa DNK molekulom, lipidima i proteinima i kao rezultat nastaju oštećenja ćelija. Ukoliko su negativni faktori sredine svedeni na minimum ili se nalaze u granicama podnošljivim za vrstu, ROS eliminišu enzimske i neenzimske komponente antioksidativnog sistema biljke (Bowler i sar., 1992).

Mnoge ćelijske organele mogu biti potencijalni izvor ROS. Glavni izvor ROS kod biljaka su hloroplasti koji pigmentima u fotosistemu I i II apsorbuju svetlosnu energiju i transportuju je pomoću elektron transportnog lanca do krajnjeg akceptora elektrona $NADP^+$. U ostale organele koje mogu proizvoditi ROS spadaju peroksizomi, mitohondrije, citohromi i endoplazmatični retikulum (Mittler, 2002).

ROS funkcionišu i kao signalni molekuli u mnogim važnim aspektima životnog ciklusa biljaka kao što su odbrana od patogena, ćelijska smrt, rastenje, morfogeneza i ekspresija određenih gena. Dokazano je da je najmanje 80 gena kod biljaka indukovano reaktivnim kiseoničnim vrstama (Vranova i sar., 2002; Apel i Hirt, 2004).

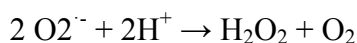
Antioksidativni sistem biljaka kojim se uklanjaju ROS može biti enzimski i neenzimski. U prvi deo sistema spadaju enzimi kao što su katalaze, peroksidaze, superoksid dismutaza, askorbat peroksidaze, glutation reduktaze, monodehidroaskorbat reduktaze i

dehidroaskorbat reduktaze. U neenzimski deo antioksidativnog sistema spadaju metaboliti kao što su β -karoten, askorbinska kiselina, vitamin E, glutation, zeaksantin i polifenolna jedinjenja (Apel i Hirt, 2004).

1.2.1. Antioksidativni enzimi biljaka

1.2.1.1. Superoksid dismutaze (SOD)

Superoksid dismutaze (SOD) su metaloenzimi koji katalizuju dismutaciju superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot -}$) do kiseonika i vodonik peroksida:



Aktivnost ovog enzima određuje koncentracija superoksid anjon radikala i vodonik peroksida, dve komponente Haber-Weissove reakcije kojom nastaje veoma reaktivan i nepoželjan hidroksil radikal, i stoga spada u prvu liniju odbrane ćelije od nagomilanih ROS (Bowler i sar., 1992). Superoksid anjon radikal može nastati na bilo kom mestu u ćeliji gde postoji elektron transportni lanac, i stoga nije neobično što se različite izoforme SOD nalaze u skoro svim ćelijskim organelama (Elstner, 1991; Alscher i sar., 2002). Elektron transportni lanac u mitohondrijama je veoma osteljiv na razne vrste biotičkih i abiotičkih stresova i usled toga formira veliki broj superoksidnih anjona (Vandlerberghe i McIntosh, 1992). Superoksid dismutaza direktno utiče na koncentraciju superoksidnog anjona u biljnoj ćeliji i njena aktivnost se povećava ukoliko je biljka izložena osmotskom stresu, suši, patogenima, ultraljubičastom zračenju itd.

U zavisnosti od metalnog kofaktora, enzim je klasifikovan na: Fe-SOD, Mn-SOD, Cu/Zn-SOD i Ni-SOD (Bannister i sar., 1987).

Fe-SOD je najstarija izoforma superoksid dismutaze koja kao metalni kofaktor na aktivnom mestu sadrži gvožđe. Ta izoforma SOD je prisutna je u obliku dimera sa po jednim atomom metala u svakoj subjedinici (Asada i sar., 1980) i javlja se kod prokariota i eukariota najčešće u hloroplastima (Gomez i sar., 1999). Aktivnost Fe-SOD inhibirana je

vodonik peroksidom. Prisustvo ove izoforme enzima nije detektovano kod životinja što može biti potvrda teorije da je nastao u plastidima (Bowler i sar., 1994).

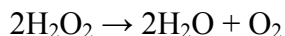
Mn-SOD je takođe veoma stara izoforma enzima, prisutna kod prokariota i eukariota i vrlo slična Fe-SOD izoformi. Aktivno mesto Fe i Mn-SOD sadrži istu aminokiselinsku sekvencu (Michalski, 1996). Ova izoforma SOD uglavnom je zastupljena u mitohondrijama i peroksizomima (Bowler i sar., 1992), a na aktivnom mestu sadrži jedan Mn³⁺ po subjedinici. Mn-SOD nije osetljiva na vodonik peroksid i KCN.

Cu/Zn SOD je zastupljena većinom kod eukariota i prvobitno je pronađena u citoplazmi (Hernandez i sar., 2000), ali je njena aktivnost potvrđena i u hloroplastima (Gomez i sar., 1999). Aktivnost ove izoforme se može inhibirati i cijanidom i vodonik peroksidom. Cu/Zn SOD je sastavljena od dve subjedinice od kojih svaka sadrži jedan Cu²⁺ i jedan Zn²⁺ na aktivnom mestu (Michalski, 1996).

Ni-SOD je homoheksamer, nađen kod nekih prokariota (Miller, 2004).

1.2.1.2. Katalaze (CAT)

Katalaze su metaloenzimi, sa hem prostetičnom grupom, koji uklanjaju vodonik peroksid razlažući ga do vode i kiseonika:

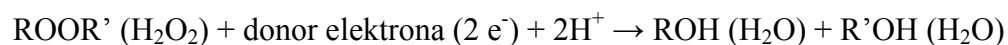


Ovi enzimi nađeni su i kod biljaka i kod životinja, kao i kod svih aerobnih mikroorganizama (Abassi i Kushad, 1998; Bailly i sar., 2004). Postoje tri tipa katalaza, od kojih su najbolje proučene tzv. „tipične“ katalaze sa četiri prostetične grupe. Katalaze se u najvećem procentu nalaze u peroksizomima (Dat i sar., 2000), ali je njihovo prisustvo dokazano i u drugim organelama. Katalaze imaju ulogu u odbrani biljaka od štetnog delovanja vodonik peroksida. Velike količine vodonik peroksida sintetišu se u fotosintetičkim tkivima, naročito kada je fotosinteza pojačana, i katalaze predstavljaju prvu liniju odbrane ćelije od ovog štetnog molekula (Auh i Scandalios, 1997). Smatra se da su

katalaze glavni enzimi koji eliminišu vodonik peroksid iz biljnih ćelija (Mizuno i sar., 1998).

1.2.1.3. Peroksidaze (POX)

Peroksidaze čine grupu monomernih glikoproteina sa veoma širokim spektrom supstratne specifičnosti (Huystee i Cairns, 1982). Uloga peroksidaza je kataliza oksidacije supstrata (donora elektrona) u prisustvu peroksida. Na taj način nastaju voda i kiseonik:



Peroksidaze se nalaze u citoplazmi, vakuolama, peroksizomima i ćelijskom zidu (Gaspar i sar., 1982) i uključene su u veliki broj reakcija u ćeliji kao što su oksidacija fenolnih jedinjenja, lignifikacija i umrežavanje polisaharida ćelijskog zida (Passardi i sar., 2004), a imaju i ulogu u rasteњу i razviću biljaka (Huystee, 1987). Postoje podaci da su peroksidaze uključene u katabolizam auksina (Passardi i sar., 2005) i da učestvuju u odbrani biljaka od patogenih i oksidativnog stresa (Sgherri i sar., 2004; Veljović-Jovanović, 2006). Potvrđena je njihova uloga u odbrani pojedinih biljnih vrsta od stresa izazvanog velikom količinom teških metala. Smatra se da peroksidaze učestvuju u akumulaciji teških metala i njihovom izolovanju od ostalih delova biljke (Lavid i sar., 2001a; Lavid i sar., 2001b). Postoje POX koje koriste kao supstrat više donora elektrona i one koje koriste samo jedan. Dele se na tri grupe:

klasa I, unutarćelijski enzimi kod biljaka, bakterija i kvasca;

klasa II, ekstracelularni enzimi kod gljiva;

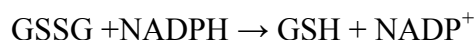
klasa III, enzimi koji su prvi put opisani kao peroksidaze. Ova klasa peroksidaza se transportuje iz ćelije ili u vakuolu (Rahnama i Ebrahimzadeh, 2006), a još se zovu i biljne peroksidaze (Passardi i sar., 2005).

Klasa III, odnosno biljne peroksidaze, redukuju vodonik peroksid uzimajući elektron sa različitih donora kao što su fenolne komponente, prekursori lignina, auksin ili sekundarni metaboliti (Hiraga i sar., 2001). Ove peroksidaze su se pojavile verovatno u

vreme kad i prve kopnene biljke i od tada se broj gena koji ih kodira konstantno uvećavao, pa se samim tim povećao i broj reakcija u kojima učestvuju, a koje su deo velikog broja fizioloških procesa kod biljaka (Penel i sar., 1992; Hiraga i sar., 2001). Peroksidaze klase III imaju ulogu u klijanju semena i tokom prvih dana štite biljku od patogena (Scialabba i sar., 2002), a mogu se aktivirati i u slučaju fizičke povrede biljke (Reymond i sar., 2000), senescencije (Jimenez i sar., 1998) i tokom rastenja i sazrevanja plodova (Alexander i Grierson, 2002).

1.2.1.4. Glutation reduktaza (GR)

Glutation reduktaza je homodimer sa FAD molekulom u aktivnom centru. Katalizuje reakciju redukcije glutacion disulfida (GSSG) u glutation (GSH) koji je važan antioksidant u ćeliji (Inzé i Montagu, 1995). Za svaki mol redukovanog GSSG, potreban je jedan mol NADPH:



Glutation reduktaza se nalazi i kod biljaka i kod životinja i deo je antioksidativnog sistema u okviru askorbat-glutation ciklusa i glutacion peroksidaznog ciklusa.

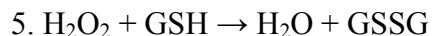
Askorbat-glutation ciklus:

1. $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{askorbat} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{monodehidroaskorbat (MDA)}$
2. $\text{MDA} + \text{NADPH} \rightarrow \text{askorbat} + \text{NADP}^+$
3. $\text{dehidroaskorbat} + \text{GSH} \rightarrow \text{askorbat} + \text{GSSG}$
4. $\text{GSSG} + \text{NADPH} \rightarrow \text{GSH} + \text{NADP}^+$

Prva reakcija ciklusa katalizovana je pomoću enzima askorbat peroksidaze (APX) koja redukuje askorbat do MDH. MDH je redukovan od strane monodehidroaskorbat reduktaze (MDAR) do askorbata. Dehidroaskorbat nastaje spontano od MDH i redukovan

je do askorbata enzimom dehidroaskorbat reduktazom (DHAR) uz pomoć glutaciona koji se oksiduje do glutation disulfida. Ciklus se završava glutation reduktazom (GR) koja konvertuje GSSG ponovo do GSH (Apel i Hirt, 2004).

Glutation peroksidazni ciklus:



Glutation peroksidaza prevodi vodonik peroksid do vode koristeći GSH kao reduktant. Oksidovani GSSG se ponovo prevodi do GSH pomoću glutation reduktaze i NADPH (Apel i Hirt, 2004). Glutation reduktaza je glavni izvor glutaciona u ćeliji koji je važan antioksidant, a samim tim i važan deo antioksidativnog sistema biljaka. Glutation se nalazi u citoplazmi, endoplazmatičnom retikulumu, vakuolama i mitohondijama (Jimenez i sar., 1998) i zajedno sa oksidovanim oblikom glutation disulfidom održava redoks potencijal ćelije (Blokhina i sar., 2003). Uloga GSH u redoks regulaciji gena je dokazana (Wignate i sar., 1988; Alscher, 1989) kao i uloga GSH/GSSG redoks para koji takođe utiče na regulaciju ćelijskog ciklusa (Sanchez-Fernandez i sar., 1997). GSH učestvuje neenzimski u antioksidativnom sistemu zajedno sa drugim ROS (Larson, 1988) zahvaljujući svom visokom reduktivnom potencijalu. GSH takođe regeneriše druge veoma važne antioksidante kao što je askorbinska kiselina u askorbat glutation ciklusu (Noctor i Foyer, 1998), a učestvuje i u proizvodnji NADP^+ koji je neophodan u elektron transportnom lancu fotosistema I i na taj način ima direktno učešće u procesu fotosinteze (Steffen i Palta, 1987).

1.2.2. Oksidativni stres kod biljaka tokom morfogeneze *in vitro*

Oksidativni stres *in vitro* je dosta proučavan, ali su mehanizmi njegovog delovanja, kao i način na koji se biljke bore protiv njega, još uvek nedovoljno objašnjeni (Ziv, 1991; Jain i sar., 1998).

Povrede tkiva biljaka prilikom uvođenja u kulturu *in vitro*, kao i prilikom svake subkulture dovode do oksidativnog stresa (Yahraus i sar., 1995). Povrede biljnih tkiva mogu biti okidač za ćelijske deobe (Sangwan i sar., 1992), a postoje podaci koji govore da bi trebalo biljku donora povrediti neposredno pre sečenja eksplantata da bi ona već pripremila svoju liniju odbrane. Povredom tkiva prilikom izolacije materijala aktivira se proces oksidacije IAA što je veoma česta pojava koja se dešava *in vitro* (Barciszewski i sar., 1997). Koncentracija etilena se znatno povećava prilikom povređivanja biljke, a ovaj regulator rasteća je uključen u proces somatske embriogeneze i u interakciju s drugim hormonima (Karami i Saidi, 2010). Površinska sterilizacija početnog materijala natrijum hipohloritom (Wiseman i Halliwell, 1996) ili živinim hloridom (Patra i sar., 1997) takođe dovodi do produkcije velike količine ROS.

ROS koji se formiraju prilikom oksidativnog stresa dovode do oštećenja ćelija i mogu dovesti do oštećenja membrana, peroksidacije lipida, oštećenja nukleinskih kiselina, agregacije i fragmentacije proteina. Ova oštećenja biljne ćelije mogu dovesti do gubitka ćelijske kompetencije (Lambe i sar., 1997), hiperhidričnosti (Olmos i sar., 1997), somaklonalnog variranja (Jain i sar., 1998) i formiranja somatskih embriona (Cassells i Curry, 2001). Oksidativni stres može uticati na promenu odnosa citokinina i auksina (Jia i sar., 1996) kao i na metabolizam etilena (Pell i sar., 1997).

U mnogim radovima je pokazano da je metilacija DNK povezana sa formiranjem embriogenih ćelija. Visok stepen metilacije DNK primećen je kod ranih stadijuma somatske embriogeneze bundeve i to na hranljivoj podlozi koja sadrži 2,4-D. Različitim analizama koje opisuju stepen DNK metilacije potvrđeno je da postoje veoma velike razlike, koje su nastale delovanjem oksidativnog stresa, između biljaka regenerisanih *in vitro*. Razlike se uočavaju u okviru same biljke, populacije biljaka kao i među populacijama (Karp i sar., 1998). Stepem metilacije DNK snižava se tokom sazrevanja somatskih embriona. Pored uticaja na metilaciju DNK, 2,4-D kao stresni faktor deluje i na modifikaciju metabolizma endogene indol sirćetne kiseline i kao sintetički auksin ima veći efekat na indukciju somatske embriogeneze od IAA, jer se ne može metabolizovati u biljnim tkivima (Karami i Saidi, 2010).

Oksidativni stres u kulturi dovodi i do promene u broju hromozoma i to češće u kulturama kalusa nego u kulturama izdanaka, što govori o veoma velikom stepenu gubitka kompetencije ćelija kalusa za dalju regeneraciju (Valente i sar., 1998). Usled pomenutih genetičkih varijabilnosti nastalih delovanjem ROS, najbolje je za početni materijal odabrati mladu biljku čije ćelije još uvek imaju isti genetski materijal (Curry i Cassels, 1998).

Veoma česta morfološka anomalija koja nastaje usled oksidativnog stresa *in vitro* može se uočiti na izdancima u vidu hiperhidriranosti (vitifikacija) (Debergh i sar., 1992). Ta pojava je često povezana sa nekrozom listova i pupoljaka, gubljenjem apikalne dominacije i kalusiranjem donjeg dela stabla (Ziv, 1991; Preece i Sutter, 1991). Smanjenje oksidativnog stresa *in vitro* može se postići menjanjem sastava hranljive podloge, dodavanjem neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema biljaka u hranljivu podlogu (npr. askorbinska kiselina) kao i promenom oblika i veličine suda u kojem se biljka gaji da bi se poboljšala aeracija (Cassels i sar., 2001).

1.3. Opšte karakteristike roda *Fritillaria*

Rod *Fritillaria* pripada familiji *Liliaceae* i broji oko 100 vrsta geofita, rasprostranjenih u umerenom regionu severne polulopte. Izvesni autori tvrde da je broj vrsta roda *Fritillaria* daleko veći od 100 i da dostiže 160 opisanih vrsta, razdvojenih po anatomskim (Coroneanu i Popescu, 1981; Naohiro i Kenji, 2006; Zhou i sar., 2007) i genetskim (Tsoi i sar., 2003; Li i sar., 2009) karakteristikama. Najveći broj vrsta nalazi se u Turskoj, Kini, SAD (Kaliforniji) i Grčkoj, ali se za centar nastanka najčešće navodi Iran (Kamari i Phitos, 2006). U Evropi, vrste roda *Fritillaria* zastupljene su pre svega u južnom i jugoistočnom delu.

Ukrasne vrste roda *Fritillaria* su veoma atraktivne baštenske biljke usled veoma neobičnog visećeg, zvonastog oblika cveta koji može biti različito upadljivo obojen i neretko sa šarom u vidu šahovskog polja. Neobična boja cveta zaslužna je za to što su pojedine vrste izabrane za zaštitni znak na zastavama i grbovima nekih zemalja, kao što su Velika Britanija, Švedska i Hrvatska. Izuzetan napor u kultivaciji pojedinih vrsta, kao što je *F. imperialis*, načinjen je još u XVI veku u Istočnoj Evropi (Alp i sar., 2009).

Mnoge vrste roda *Fritillaria* su endemične i veoma retko se nalaze u prirodi, te su često zaštićene zakonom. *F. persica* i *F. imperialis* zakonom su zaštićene u Turskoj gde je i pokrenut projekat za njihovo očuvanje i pospešivanje kultivacije u prirodi, kao i zakonom utvđena kazna za nedozvoljeno prikupljanje biljaka i lukovica (Kizil i sar., 2008).

U flori Republike Srbije zastupljeno je pet vrsta: *F. meleagris* L. (košutica), *F. degeniana* J., *F. montana* Hoppe, *F. gracillis* Ebel i *F. graeca*, koja je endemit Balkanskog poluostrva. Značajna karakteristika roda je visoka koncentracija različitih alkaloida, najčešće izolovanih iz lukovica, što vrste ovog roda svrstava u sam vrh biljaka koje se vekovima uspešno koriste u narodnoj medicini Turske (Rahman i sar., 2002), Kine (Li i sar., 2006) i Japana (Sho i sar., 1963, Kaneko i sar., 1981). Lekovito dejstvo ovih biljaka dokazano je kod oboljenja disajnih organa kao što su kašalj, astma i nakupljanje sluzi u plućima (Li i sar., 2006). Pojedini lekovi koji se i danas koriste u modernoj medicini za lečenje disajnih tegoba i povišenog krvnog pritiska imaju u svom sastavu sekundarne metabolite izolovane iz vrste roda *Fritillaria* (Nalawade i sar., 2003). Aktivne supstance iz ovih biljaka smanjuju sintezu histamina, dok ujedno povećavaju akumulaciju gama interferona. Od svih supstanci, analiziranih iz lukovica, najveći procenat pripada izosteroidnim alkaloidima (72,7%). Ostatak čine steroidni alkaloidi (11,5%) i nealkaloidne supstance (15,8%) (Lin i sar., 2001). Izosteroidni alkaloidi *Fritillaria* svrstani su u tri grupe: cevanin, jervinin i varatramin tip alkaloida. Alkaloid 5 α – cevanin je dominantan izosteroidni alkaloid roda *Fritillaria* (Rahman i sar., 1993, Rahman i sar., 1997). Neki autori navode da izvesne hemijske varijacije u cevanin tipu alkaloida mogu biti karakteristika geografskog položaja na kom su biljke rasprostranjene (Yu i Xiao, 1992).

Pored visokog sadržaja pomenutih alkaloida, vrste ovog roda odlikuju se i veoma visokim sadržajem skroba, što neke autore navodi da biljke roda *Fritillaria* posmatraju kao jedan od potencijalnih izvora hrane u budućnosti (Wang i sar., 2005 a, b, c). Oblik i veličina skrobnih zrna može biti značajna karakteristika vrste (Liu i sar., 1997).

1.3.1. Opšte karakteristike košutice (*F. meleagris* L.)

Košutica, *Fritillaria meleagris* (Slika 5) je višegodišnja, lukovičasta geofita koja je uglavnom rasprostranjena u umerenom regionu severne hemisfere. Cvetovi su u obliku zvona, ljubičasti do beli sa šarom u obliku šahovskog polja. Cveti u periodu od marta do maja da bi nepovoljan vegetativni period provela u obliku lukovice pod zemljom, čekajući naredno proleće. Rasprostranjena je najčešće na zabarenim livadama i plavljenom zemljištu do 800 metara nadmorske visine. Različita narodna imena vezuju se za ovu vrstu kao što su košutica (Srbija), kockavica (Hrvatska) i Snake'Head (Engleska).



Slika 5. *Fritillaria meleagris* L. gajena u uslovima staklenika.

Francuska, Slovenija i Rumunija proglasile su košuticu za zakonom zaštićenu vrstu. Iako je široko rasprostranjena u Evropi, retko se nalazi u prirodi, ali je veoma često viđena po baštama. Isušivanje močvarnog zemljišta i zasejavanje livada dovelo je do smanjenja brojnosti košutice u Evropi (Zhang i Hytteborn, 1985).

1.4. Razmnožavanje biljaka vrsta roda *Fritillaria*

1.4.1. Vegetativno i generativno razmnožavanje biljaka vrsta roda *Fritillaria*

Lukovičaste vrste se u prirodnim uslovima razmnožavaju vegetativno ili semenom. Vegetativno razmnožavanje podrazumeva regeneraciju novih lukovica na matičnoj lukovici. Tokom nepovoljnih perioda godine, biljke preživljavaju u formi lukovice, koja postaje dormantna. Kod ovih biljnih vrsta se razvila dormancija da bi preživele duge periode nepovoljnih uslova za rastenje i razviće kao što su suša ili hladni zimski period (Vegis, 1964). Dormancija se dešava tokom životnog ciklusa geofita i neophodna je za njihovo normalno razviće (Kamenetsky i sar., 2003). Visoke temperature dovode do dormancije, dok je niske temperature prekidaju. Ukoliko tokom dužeg perioda nema niske temperature, rast biljaka je veoma spor, dok se cvetovi ne razvijaju ili su deformisani (De Hertogh i Le Nard, 1993). U dormantnim semenima i organima je zaustavljeno klijanje i rastenje na način koji još uvek nije razjašnjen (Bewley, 1997). Spoljašnji uslovi tokom perioda dormancije su zaslužni za njen prekid u određenom trenutku. Na dormantnim lukovicama ne mogu se primetiti spoljašnje morfološke promene ili rast, ali unutar lukovice dešavaju se razne fiziološke i morfološke promene kao što su diferencijacija cvetnog pupoljka ili korena (Le Nard, 1983).

Mnoge vrste roda *Fritillaria* započinju dormanciju početkom leta da bi niske temperature tokom zimskih meseci dovele do prekida dormancije i ponovnog klijanja u proleće, te cvetanja u leto naredne godine (Zhu, 1980; Sun i Wang, 1991).

Posle prekida perioda dormancije dužim periodom niskih temperatura, lukovica se dalje razvija. Nekoliko faktora diktira trajanje odnosno prekid dormancije u lukovicama: smanjeno prisustvo određenih proteina (Higuchi i Sisa, 1967), promene u nivou giberelina i abscisinske kiseline (Rakhimbaev i sar., 1978; Aung i De Nortogh, 1979; Gorin i Heidema, 1985; Rebers i sar., 1995), amilazno zavisna degradacija skroba (Nowak i sar., 1974; Hobson i Davies, 1977; Banasik i sar., 1980) i vezivanje vode sa velikim molekulima odnosno njeno oslobađanje iz hidratisanih molekula (Yamazaki i sar., 1995; Okubo i sar.,

1997; Zemah i sar., 1999). U velikom broju slučajeva, nakon prekidanja dormancije, dolazi do pojačanih ćelijskih deoba (Okagami, 2003; Rohde i Bhalerao, 2007).

Vegetativnim načinom razmnožavanja lukovičastih vrsta, jedna lukovica može proizvesti dve-tri nove lukovice u zavisnosti od uslova sredine i tehnika koje se primenjuju (Paek i Murthy, 2002; Langens-Gerrits i sar., 2003; Ulug i sar., 2010).

Razmnožavanje semenom je sporije od vegetativnog načina razmnožavanja i zahteva puno vremena, pa samim tim i nema praktičnu primenu. Klijanci se sporo razvijaju, potrebno im je nekoliko godina da dostignu zrelost i komercijalno prihvatljivu veličinu (Paek i sar., 1996; Witomska i Lukaszewska, 1997; Gao i sar., 1999). Hlađenje tokom određenog vremena je takođe neophodno za semena većine vrsta *Fritillaria* (Chen i sar., 1993).

1.4.2. Regeneracija biljaka vrsta roda *Fritillaria in vitro*

Istraživanja na primeni metoda kulture tkiva za vegetativno razmnožavanje biljaka vrsta roda *Fritillaria* otpočeta su pre 35 godina u Kini na vrstama koje su imale dokazan medicinski značaj, kao što su *F. thunbergii* (Sun i sar., 1977), *F. pallidiflora* (Hao i sar., 1982) i *F. ussuirensis* (Zhao i sar., 1983). Uspešnost *in vitro* razmnožavanja zavisi od razvojnog stadijuma biljke, izbora eksplantata, sastava hranljive podloge, kombinacije regulatora rastanja i *in vitro* tehnika koje se koriste. Do danas je zabeležen veliki broj radova o uspešnoj indukciji morfogeneze *in vitro* kod vrsta roda *Fritillaria* u kulturi tkiva.

1.4.2.1 Regeneracija biljaka vrsta roda *Fritillaria* putem organogeneze

Proces organogeneze i formiranje lukovica u kulturi tkiva do sada je opisan kod 17 vrsta roda *Fritillaria* (Tabela 2).

U većini opisanih protokola kao početni eksplantati za uspostavljanje aseptičnih kultura korišćene su cele lukovice (Kukulezanka i sar., 1989; Gao i sar., 1999), kao i vertikalno (Paek i Murthy, 2002) ili horizontalno sečeni segmenti lukovice (Joshi i sar., 2007). Sterilizacija lukovica je obično jednostavna (15-20 min NaOCl, 70% alkohol i

sterilna voda), a česta bakterijska kontaminacija do koje obično dolazi prilikom uvođenja lukovica u kulturu može se izbeći dodavanjem antibiotika u hranljivu podlogu (Paek i sar., 1996; Seon i sar., 1999).

Pored lukovice kao početni eksplantati za uspostavljanje *in vitro* kultura, mogu se koristiti i drugi delovi biljke. Nekada je potrebno, naročito kada se radi o ugroženoj vrsti, tražiti nove izvore eksplantata (Lukaszewska i sar., 1997; 1998; Mohammadi-Dehcheshmeh i sar., 2007). Ostali biljni organi koji mogu služiti kao eksplantati su listovi (Sun i sar., 1977; Wu i Tang, 1992; Paek i sar., 1996; Otani i Shimada, 1997; Witomska i Lukaszewska, 1997), stablo (Hao i sar., 1995; Paek i sar., 1996; Witomska i Lukaszewska, 1997; Shiau i sar., 2000; Paek i Murthy, 2002), delovi stabla (Seon i sar., 1999) i krunični listići (Mohammadi-Dehcheshmeh i sar., 2008). Korišćenjem delova stabla kao eksplantata, dobija se veći broj novoformiranih lukovica *F. thunbergii* u odnosu na broj lukovica koje se dobijaju iz segmenta lukovice na istoj hranljivoj podlozi (Seon i sar., 1999). Regeneracija lukovica iz delova stabla zavisi od fiziološkog stanja i starosti eksplantata. Mlađa stabla imaju daleko veći regenerativni kapacitet (stabla niža od 10 cm) (Paek i sar., 1996). Listovi *F. camtschatensis* gajeni na LS (Linsmaier i Skoog, 1964) hranljivoj podlozi uz dodatak NAA i piklorama regenerisali su mnogo manje lukovica (26%) od segmenata stabla stavljenog na istu hranljivu podlogu (97%) (Otani and Shimada, 1997).

Segmenti stabla *F. imperialis* takođe pokazuju veći regenerativni kapacitet od segmenata lukovice pod istim eksperimentalnim uslovima (Witomska and Lukaszewska 1997). U kulturi segmenata stabla na MS (Murashige i Skoog, 1962) hranljivoj podlozi sa NAA i BAP regeneriše se 95% lukovica po eksplantatu. Pored delova stabla, efikasan eksplantat za regeneraciju velikog broja lukovica *F. imperialis* su krunični listovi (Mohamadi-Dehcheshmeh i sar., 2008). Krunični listovi su gajeni na B5 hranljivoj podlozi obogaćenoj sa IAA, NAA i BAP. U prisustvu nižih koncentracija BAP postignuta je najbolja regeneracija. Zreli krunični listovi imali su veći regenerativni kapacitet u poređenju sa nezrelim.

Mineralni rastvor u većini protokola za regeneraciju lukovica bio je MS (Murashige i Skoog, 1962), ali je uspešna regeneracija postignuta i sa N6 (Ozcan i sar., 2007), LS (Otani i Shimada, 1997) i FA mineralnim rastvorom (Kukulezanka i sar., 1989).

Tabela 2. Spisak vrsta roda *Fritillaria* kod kojih je postignuta regeneracija procesom organogeneze.

Vrsta	Eksplantat	Hranljiva podloga (regulatori rastenja u mg/l)	Reference
<i>F. alburyana</i>	segment lukovice	MS + BAP 4+NAA 0,25; N6+2,4-D 2	Ozcan i sar., 2007.
<i>F. anhuinensis</i>	lukovica	MS + NAA 2 + KIN 2	Xue i sar., 2008.
<i>F. camtschatcensis</i>	segment lukovice, list	LS + NAA 0,1 ili pikloram 0,1	Otani i Shimada, 1997.
	segment lukovice	MS + NAA 0,1+EB 0,1	Ohkawa i Kitajima, 1998.
	segment lukovice	MS + NAA 1,0+KIN 0,1+0,01 EB	Ohkawa i sar., 1999.
	lukovica	MS + NAA 0,1+KIN 0,1	Okawa i Kei, 2000.
<i>F. cirrhosa</i>	segment lukovice	MS + NAA 1,0+BAP 2	Wang i sar., 2002.
<i>F. hupehensis</i>	segment lukovice	MS + NAA 4,0+BAP 0,5	Chen i sar., 2000; Yang i sar., 2001.
	delovi stabla		Shiau i sar., 2000.
<i>F. imperialis</i>	segment lukovice,	MS + NAA 0,5+ BAP 1	Witomska i Lukaszewska, 1997;1998.
	delovi stabla ili cveta krunični listovi	MS+ NAA 0,6 + IAA 0,4 + BAP 1	Lukaszewska i sar., 1998.
<i>F. meleagris</i>	lukovice	MS ili FA + NAA 1 + BAP 0,5-2	Mohammadi-Dehcheshmeh i sar., 2008.
<i>F. pallidiflora</i>	segment lukovice	MS + IAA 1 + NAA 0,2 + KIN 0,1	Kukulezanka i sar., 1989.
	lukovica	MS + 2,4-D +KIN; MS + NAA 1 +KIN 0,1	Hao i sar., 1982.
	lukovica	MS + IAA 1 + NAA 0,2 + KIN 0,1	Wang i sar., 1987.
<i>F. przewalskii</i>	lukovica	MS (ili MS/2) + NAA 2 + 2,4-D 2 + BAP 0,5 + IBA 0,5 + KT 0,2	Sun i Wang, 1991.
<i>F. roylei Hook</i>	segment lukovice	MS + KIN 1,1 + NAA 1	Wang i sar., 2009.
<i>F. sichuanica</i>	segment lukovice	MS + 2,4-D 1 + KIN 0,1;MS + NAA 0,2 + IAA 0,1 + KIN 0,1	Joshi i sar., 2007.
<i>F. sinica</i>	stablo	MS + NAA 1 + BAP 0,5	Qiao i sar., 1986.
<i>F. taipaiensis</i>	segment lukovice	MS + NAA 1 + BAP 3	Hao i sar., 1995.
<i>F. thunbergii</i>	list	MS + NAA 2 + KIN 1	Liu i sar., 1996.
	segment lukovice,	MS + NAA 0,3 + KIN 1	Sun i sar., 1977.
	cvet i stablo		Peak i sar., 1996.
	segment lukovice	MS + NAA 0,1 + KIN 1	Seon i sar., 1999.
<i>F. unibractetata</i>	lukovica	MS + NAA 1 + ZEA 2	Paek i Murthy, 2002.
	lukovica	MS + BAP 1 + IAA 1	Yuan i sar., 2005.
	lukovica	MS + NAA 0,5 + KIN 1	Gao i sar., 1999.
<i>F. ussuirensis</i>	segment lukovice	MS + NAA 0,5 + KIN 1	Zhao i sar., 1983; Sun i Wang, 1991.
	stablo, list	MS+ IBA1+ZEA 1;MS+IAA 0,5+BAP 2; MS+IAA 2+KT 0,5	Wu i Tang, 1992.
	lukovica	MS+NAA 4; MS+NAA 2+BAP 0,5; MS+2,4-D 2+BAP 0,5	Sun i sar., 2008.
<i>F. whittallii</i>	segment lukovice	MS+BAP 4+NAA 0,25; N6+2,4-D 2	Ozcan i sar., 2007.

Načešće korišćeni regulatori rastenja, što se tiče auksina, bili su NAA, u opsegu koncentracije od 0,1 do 4 mg/l ili IAA korišćen u koncentraciji od 0,1 do 1 mg/l. U kombinaciji sa auksinima najzastupljeniji citokinini bili su BAP koncentracije od 0,5 do 4 mg/l ili KIN dodavan u koncentraciji od 0,1 do 2 mg/l.

Gao i sar. (1999) objavili su da je najefikasnija kombinacija za regeneraciju najvećeg broja lukovica *F. unibracteata* MS hranljiva podloga sa dodatkom IAA i BAP. Posle 50-60 dana u kulturi broj lukovica dostiže maksimum. Autori navode da je broj lukovica regenerisanih *in vitro* daleko veći od broja lukovica koje se mogu dobiti u prirodnim uslovima.

Male koncentracije NAA i piklorama imaju snažan uticaj na regeneraciju lukovica *F. camtschatensis* (Otani and Shimada, 1997). Lukovice ove vrste mogu se regenerisati u kulturi segmenta lukovica i na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja, ali se najbolji rezultati dobijaju kombinacijom oba regulatora rastenja..

Kukulezanka i sar. (1989) opisali su proces regeneracije lukovica *F. meleagris* na MS ili FA hranljivoj podlozi koja sadrži samo BAP ili kombinaciju NAA i BAP. Pokazano je da je kombinacija ova dva regulatora rastenja najbolja i da dovodi do regeneracije do lukovica po eksplantatu.

Pozitivno delovanje zeatina uočeno je u kulturi korenova i stabla kod *F. ussuriensis* (Wu and Tang, 1992). Povoljan uticaj na regeneraciju lukovica *F. camtschatensis* je imao 24-epibrasidinolid (EB) (Ohkawa i Kitajima, 1998; Ohkawa i sar., 1999).

Glavni faktori koji utiču na rasteenje i klijanje novoformiranih lukovica *in vitro* su dormancija, veličina lukovice i njena zrelost kao što je pokazano kod *Lilium* (Langens-Gerrits i sar., 2003). Lukovice regenerisane u uslovima *in vitro* postaju dormantne u velikom procentu prestaju da rastu i formiraju listove (Li i Qin, 1987; Gao i sar., 1999; Paek i Murthy, 2002; Langens-Gerrits i sar., 2003; Nikolić i sar., 2008). U cilju prevazilaženja dormancije često je potreban period od nekoliko nedelja izlaganja niskim temperaturama (oko 4 °C) da bi dormancija bila prekinuta. Kod *F. camtschatensis* (Otani i Shimada, 1997) i *F. imperialis* (Lukaszewska i sar., 1998) nije potreban period niskih temperatura za potpuno razvijanje lukovica regenerisanih u uslovima *in vitro*, dok je kod ostalih vrsta period izlaganja niskim temperturama neophodan.

Lukovice *Lilium speciosum* and *F. thunbergii* regenerisane *in vitro* na temperaturama nižim od 15 °C pokazuju mnogo manji procenat dormancije od lukovica regenerisanih na 24 °C (Aguettaz i sar., 1990; Sun i Wang, 1991; De Klerk, 2009).

Tokom perioda dormancije lukovice se pripremaju za klijanje i kompletno razviće biljke. Poboljšanje klijanja lukovica *Lilium speciosum* može biti postignuto kratkim tretmanom giberelinima (Niimi i sar., 1988) koji mogu biti primenjeni sa ili bez izlaganja niskim temperaturama. Gerriits i sar. (1992) dokazali su stimulativnu ulogu giberelina u procesu klijanja dormantnih lukovica, ali dalje razviće biljaka nije bilo uspešno. Tretman niskim temperaturama u trajanju od nekoliko nedelja pre gajenja lukovica *F. thunbergii* na hranljivim podlogama sa različitim regulatorima rasteња može uticati na povećanje procenta regeneracije novih lukovica (Paek, 1996). Različiti pretretmani kao što je povećana koncentracija saharoze u hranljivoj podlozi mogu manje ili više uticati na sposobnost regeneracije i prevazilaženje dormancije lukovica (Langens-Gerrits, 2003b). Tokom perioda dormancije menja se sadržaj ugljenih hidrata u lukovicama tj. dolazi do njihove akumulacije. Akumulirani ugljeni hidrati se koriste tokom narednog vegetativnog perioda za početak procesa klijanja (Miller i Langhans, 1990). Na niskim temperaturama dolazi do razlaganja skroba u lukovicama i skladištenja veće količine saharoze (Shin i sar., 2002) i šećera manje molekulske mase (Miller i Langhans, 1990; De Hertogh i Le Nard, 1993) koji su dobijeni hidrolizom skroba. Nakupljena saharoza koristi se za klijanje lukovica posle dormancije, rast listova i razviće fotosintetičkog aparata. Fenomen razlaganja skroba i skladištenja šećera tokom dormancije lukovice veoma je dobro opisan, ali ipak ne postoji zadovoljavajuće objašnjenje o mehanizmima koji pokreću pomenuti proces (Shin i sar., 2002).

Povećana koncentracija saharoze u hranljivoj podlozi može dovesti do povećanja mase lukovice kod *Lilium speciosum* i povećanog procenta klijanja posle perioda dormancije (Yamagishi, 1995; Langens-Gerrits i sar., 2003).

1.4.2.2. Regeneracija biljaka vrsta roda *Fritillaria* somatskom embriogenezom

Regeneracija putem somatske embriogeneze postignuta je kod osam vrsta roda *Fritillaria* (Tabela 3). Najčešće korišćeni eksplantati za indukciju ovog procesa kod *Fritillaria* sp. su lukovice, segmenti lukovica, osnove listova, delovi stabla ili zigotski embrioni. Somatska embriogeneza se često odvija paralelno sa organogenezom tj. formiranjem lukovica na istom eksplantatu i pod istim eksperimentalnim uslovima (Hao i sar., 1995; Özcan i sar., 2007). Somatski embrioni mogu se formirati direktno na eksplantatu ili indirektno.

Prvi podaci vezani za indukciju somatske embriogeneze opisani su u kulturi segmenta lukovice kod *F. pallidiflora* (Hao i sar., 1982). Početni eksplantati gajeni na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN formirali su embriogeni kalus sa somatskim embrionima. Hao i sar. (1982) su opisali da je pored procesa indukcije somatske embriogeneze u kulturi segmenta lukovice moguće indukovati paralelno i organogenezu. Anatomska istraživanja pokazuju da se lukovice regenerišu od kalusa koji je poreklom od specijalizovanih ćelija epidermalnog sloja početnog eksplantata. Embriogeni kalus *F. pallidiflora* koji je tretiran niskim temperaturama tokom mesec dana, formira somatske embrione na MS hranljivoj podlozi sa IAA i KIN (Wang i sar., 1989).

U kulturi segmenta lukovice *F. ussuriensis* na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN takođe je uspešno indukovana somatska embriogeneza. Daljim gajenjem embriogenog kalusa na N6 hranljivoj podlozi sa KIN regenerišu se i lukovice (Wu i Tang, 1992).

Direktna somatska embriogeneza uspešno je indukovana u kulturi bazalnih segmenata lista *F. meleagris* L. na MS hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama 2,4-D ili KIN (Subotić i sar., 2010). Anatomska istraživanja ovog procesa pokazala su da se globularni somatski embrioni formiraju već nakon sedam dana gajenja u kulturi, a potpuno diferenciran somatski embrion formira se posle 28 dana od trenutka indukcije somatske embriogeneze.

Tabela 3. Vrste roda *Fritillaria* kod kojih je postignuta regeneracija procesom somatske embriogeneze.

Vrsta	Eksplantat	Hranljiva podloga (regulatori rastenja u mg/l)	Reference
<i>F. alburyana</i>	zigotski embrion	MS + BAP 4 + NAA 0,25; N6 + 2,4-D 2	Ozcan i sar., 2007.
<i>F. hupehensis</i>	segment lukovice, osnova stabla	MS + NAA 4 + BAP 0,5	Shiau i sar., 2000.
<i>F. imperialis</i>	krunični listovi	B5 + IAA 0,4 NAA 0,6 + BAP 0,1	Mohammadi-Dehcheshmeh i sar., 2007.
<i>F. meleagris</i>	zigotski embrion osnova lista	MS + 2,4-D 1 ili TDZ 1 MS + 2,4-D ili KIN	Petrić i sar., 2011. Subotić i sar., 2010.
<i>F. palidiflora</i>	lukovica	MS + IAA 0,1 + KIN 0,5	Wang i sar., 1989.
	lukovica	MS + 2,4-D + KIN	Xu i Zhu, 1998.
	segment lukovice	MS + 2,4-D 1 + KIN 0,1	Hao i sar., 1982.
<i>F. sinica</i>	stablo	MS + NAA 1 + BAP 0,5	Hao i sar., 1995.
<i>F. thunbergii</i>	lukovica	MS + 2,4-D 1,0 + KIN 2,0	Yuan i sar., 2005.
<i>F. ussuriensis</i>	stablo	MN + 2,4-D 2,5 + KIN 1; N6 + KIN 1	Wu i Tang, 1992.
	lukovica	MS + NAA + KIN + BAP	Xu i Zhu, 1998.
	vrh korena	ER + BAP 1+IAA 2+2,4-D 0,1; ER+BAP 1 IAA 0,1	Feng i sar., 2009.

Somatski embrioni i lukovica istovremeno su formirani u kulturi segmenata stabla *F. sinica*. Embriogeni kalus je indukovan na hranljivoj podlozi obogaćenju sa NAA i BAP. Njegovim daljim gajenjem na hranljivoj podlozi sa NAA i BAP diferenciraju se somatski embrioni na različitim stadijumima razvića i lukovice (Hao i sar., 1995). Segmenti stabla korišćeni su za indukciju somatske embriogeneze kod *F. ussuriensis* na MS ili N6 hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN. Gajenjem eksplantata na N6 hranljivoj podlozi formiran je veći broj somatskih embriona po eksplantatu u odnosu na MS hranljivu podlogu (Wu i Tang, 1992).

Delovi cveta su korišćeni za indukciju somatske embriogeneze kod *F. imperialis* (Mohammadi-Dehcheshmeh i sar., 2007). U kulturi kruničnih listića na B5 hranljivoj podlozi sa IAA, NAA i malom koncentracijom BAP uspešno je indukovana indirektna somatska embriogeneza. Embriogeni kalus je uspešno indukovan i kod *F. ussuriensis* u kulturi vrhova korenova na ER hranljivoj podlozi obogaćenju sa 2,4-D, IAA i BAP. Daljim gajenjem embriogenog kalusa na ER hranljivoj podlozi sa IAA i BAP diferenciraju se somatski embrioni koji u velikom procentu kličaju (Feng i sar., 2009).

Somatska embriogeneza u kulturi zigotskih embriona *F. meleagris* dobijena je na hranljivoj podlozi sa 2,4-D ili TDZ. Direktna somatska embriogeneza se odvija u prisustvu TDZ, dok 2,4-D indukuje indirektnu somatsku embriogenezu (Subotić i sar., 2010; Petrić i sar., 2011).

2. CILJ RADA

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je proširivanje znanja o regeneraciji geofita u uslovima kulture tkiva, na model sistemu košutice (*Fritillaria meleagris* L.). Radi ostvarivanja cilja postavljeni su sledeći zadaci:

1. Uspostavljanje efikasnog protokola za regeneraciju biljaka *F. meleagris* u uslovima *in vitro*
2. Ispitivanje uloge i značaja antioksidativnih enzima tokom prevazilaženja dormancije i klijanja lukovica *in vitro* i *ex vitro*
3. Utvrđivanje uloge antioksidativnih enzima, esteraza i arabinogalaktanskih proteina tokom indukcije morfogeneze *in vitro*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

Za uspostavljanje *in vitro* kultura kao polazni materijal korišćena su semena *Fritillaria meleagris* L. Aussaat/Sow. No. 8 (Jelitto Staudensamen GmbH, Schwarmstedt, Germany).

3.2. Priprema biljnog materijala za eksperiment

Semena su ispirana 60 minuta u tekućoj vodi u koju je dodato nekoliko kapi deterdženta. Posle toga, tretirana su 30 % rastvorom komercijalnog preparata NaOCl 2 puta u trajanju od po 10 minuta. Semena su na kraju ispirana u sterilnoj destilovanoj vodi (3 x 10 minuta) i postavljena na MS (Murashige i Skoog, 1962) hranljivu podlogu sa standardnim rastvorom soli i vitamina (Tabela 4). Nakon imbibicije od 3 dana, uklanjana je semenjača i izolovani su zreli zigotski embrioni koji su dalje gajeni na MS hranljivoj podlozi uz dodatak različitih regulatora rastenja.

In vitro formirane lukovice bile su početni materijal za ispitivanje procesa indukcije morfogeneze *in vitro*. Lukovice su sečene na odsečke (segmenti lukovice) dimenzija $\approx 5 \times 3$ mm.

Odsečki lista, formirani iz *in vitro* regenerisanih lukovica dimenzija do 1 cm dužine (baze lista), gajeni su u Petri kutijma na MS hranljivoj podlozi obogaćenoj različitim regulatorima rastenja u cilju indukcije morfogeneze *in vitro*. Procenat indukcije somatske embriogeneze i broj somatskih embriona određivan je posle mesec dana.

U cilju ispitivanja rastenja i razvića lukovica korišćene su lukovice koje su regenerisane na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja.

Za anatomska istraživanja svetlosnom i elektronskom scanning mikroskopijom korišćeni su delovi lista veličine 1×1 cm koji su gajeni na hranljivoj podlozi koja je sadržala 0,1 mg/l 2,4-D u cilju indukcije procesa somatske embriogeneze.

Tabela 4. Sastav MS rastvora soli i vitamina (Murashige i Skoog, 1962).

MS makro elementi	Koncentracija (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
MS mikro elementi	
MnSO ₄ x 7H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ x 4H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KJ	0,83
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025
CaCl ₂ x 6H ₂ O	0,025
Kompleks gvožđa	
Na ₂ EDTA	37,2
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8
Vitaminski kompleks	
vitamin B ₁	0,1
vitamin B ₆	0,5
nikotinska kiselina	0,5
glicin	0,5

Za izolaciju hlorofila, karotenoida, šećera i poliola korišćene su *in vitro* regenerisane lukovice koje su gajene na standardnoj (24 °C) i sniženoj temperaturi (4 °C) tokom 6 nedelja.

Kao polazni materijal za praćenje aktivnosti antioksidativnih enzima *in vitro* korišćene su lukovice *F. meleagris* L. gajene na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja. Aktivnost antioksidativnih enzima praćena je kod lukovica regenerisanih *in vitro* i gajenih na tri temperature (24, 15 i 4 °C) u trajanju od 8 nedelja, na početku izlaganja niskoj temperaturi (4 °C) u trajanju od 3 dana i 7 dana nakon završenog izlaganja ovoj temperaturi.

Tokom zimskog perioda (novembar – maj) lukovice su gajene u prirodnim uslovima (*ex vitro*) da bi bile izložene periodu niskih temperatura u cilju ispitivanja aktivnosti antioksidativnih enzima. Analiza aktivnosti antioksidativnih enzima rađena je kod lukovica gajenih 1, 5 i 7 meseci u prirodnim uslovima tj. krajem novembra, marta i maja.

U cilju ispitivanja aktivnosti antioksidativnih enzima tokom morfogeneze *in vitro* kao početni materijal korišćene su lukovice koje su predhodno gajene mesec dana na različitim hranljivim podlogama i pri različitim uslovima gajenja:

1. MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja na 24 °C i 3% saharoze
2. MS hranljivoj polozi bez regulatora rastenja na 4 °C i 3% saharoze
3. MS hranljivoj polozi bez regulatora rastenja na 24 °C i 4,5% saharoze

Posle 4 nedelje dana gajenja na ovim hranljivim podlogama, segmenti lukovica dalje su gajeni na MS hranljivim podlogama za indukciju morfogeneze *in vitro* koje su sadržale (u mg/l) TDZ 1 odnosno 2,4-D 1 i kinetin 1. Promena aktivnosti antioksidativnih enzima praćena je posle 7, 14, 21 i 28 dana.

Kao početni materijal korišćeni su segmenti lukovice i baza lista koji su gajeni na MS hranljivim pologama za indukciju morfogeneze koje su sadržale (u mg/l) TDZ 1 odnosno 2,4-D 1 i KIN 1. Jedan deo kultura je gajen u hladnoj komori na 4 °C mesec dana pre nego što su subkultivisane na hranljive podloge za indukciju morfogeneze, dok su ostale kulture kontinuirano gajene na temperaturi od 24 °C. Uzorci su sakupljeni posle 7, 14, 21 i 28 dana od početka indukcije.

3. 3. Osnovna hranljiva podloga

Osnovna hranljiva podloga korišćena u ovom radu sadržala je MS mineralni rastvor (Tabela 4). Osim ovih elemenata hranljiva podloga je sadržala 3 % saharoze, 0,7 % agar (Torlak, Beograd) i 100 mg/l mioinozitola (Sigma). pH podloge je podešavan na 5,8 pre autoklaviranja.

3.3.1. Hranljive podloge za indukciju morfogeneze *in vitro* u kulturi zrelih zigotskih embriona

Izolovani zigotski embrioni gajeni su na 6 hranljivih podloga obogaćenih regulatorima rastenja koji su prikazani u Tabeli 5 u cilju regeneracije lukovica i biljaka *in vitro*.

Tabela 5. Sastav hranljivih podloga za indukciju morfogeneze u kulturi zrelih zigotskih embriona.

Hranljiva podloga	Komponenta (mg/l)
osnovna hranljiva podloga	bez regulatora rastenja
osnovna hranljiva podloga	2,4-D 1 + prolin 250 + CH 250
osnovna hranljiva podloga	2,4-D 1 + KIN 1 + prolin 250 + CH 250
osnovna hranljiva podloga	TDZ 1
osnovna hranljiva podloga	BAP 1
osnovna hranljiva podloga	BAP 1 + IAA 1

3.3.2 Indukcija morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenata lukovica

Segmenti lukovice dimenzija 5×3 mm gajeni su u Petri kutijama na osnovnoj hranljivoj podlozi obogaćenoj sa 2,4-D (0,1, 0,5, 1, 2 ili 10 mg/l) ili TDZ (0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1 ili 2 mg/l) na svetlosti ili u mraku.

3.3.3. Indukcija morfogeneze *in vitro* u kulturi baze lista

Baze lista gajene su u Petri kutijama na hranljivim podlogama koje su sadržale 2,4-D (0,1, 0,5, 1, 2, 5 ili 10 mg/l) odnosno KIN (0,1, 0,5, 1, 2, 5 ili 10 mg/l) kao i na različitim

kombinacijama 2,4-D i KIN (0,1, 0,5, 1, 2, 5 ili 10 mg/l) u cilju indukcije morfogeneze *in vitro*.

3.3.4. Ispitivanje rastenja i razvića lukovica

Lukovice regenerisane *in vitro* su dalje gajene u Petri kutijama, u mraku na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja na standardnoj (24 °C) ili na sniženim temperaturama (4 i 15 °C), tokom 4, 6, 8 i 10 nedelja.

Uticao povećane koncentracije saharoze na rasteenje i razviće *in vitro* formiranih lukovica ispitivan je na MS hranljivoj podlozi koja je pored standardne koncentracije saharoze od 3% sadržala i povećane koncentracije od 4,5 ili 6 % .

U cilju ispitivanja uticaja giberelne kiseline (GA₃) na proces dormancije lukovica korišćene su lukovice koje su tretirane tokom 24 sata rastvorom GA₃ koncentracije 1, 2 i 3 mg/l. Uzorci su analizirani posle 3, 4 i 5 nedelja hlađenja na 4 °C.

3.4. Gajenje u *ex vitro* uslovima

In vitro kulture su gajene u klimatizovanoj prostoriji, na temperaturi od 24 °C i pri fotoperiodu od 16 h svetlosti i 8 h mraka. Kao izvor svetlosti korišćene su fluorescentne lampe jačine 65 W i intenziteta svetlosti od 47 µmols-1m-2. Pored toga lukovice su gajene u hladnoj sobi na 4 °C kao i na 15 °C u komori za gajenje u periodu od 0 do 10 nedelja.

Regenerisane biljke sađene su u mešavini humusa i peska (3:1) i gajene u uslovima staklenika.

3.5. Anatomsko istraživanje indukcije somatske embriogeneze

Odsecci delova lista sa somatskim embrionima su fiksirani 24 h na 4 °C u FAA fiksativu koji sadrži 5 ml 40 % formalina, 5 ml glacijalne sirćetne kiseline i 90 ml 70 % etanola (Jensen, 1962). Fiksiran materijal je ispiran, dehidriran i ukalupljen u parafin. Poprečni preseki debljine 5-7 µm, sečeni su na rotacionom mikrotomu, obojeni su

rastvorom hematoksilina i fotografisani na Litz DMRB svetlosnom mikroskopu (Lieca, Wetzlar, Germany).

Baze lista sa somatskim embrionima su bez predhodne fiksacije snimani na elektronskom scanning mikroskopu (JOEL. JSM – 6460LV, Institut za biologiju, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad).

3.6. Analiza šećera i poliola

Rastvorljivi šećeri su identifikovani i kvantifikovani upotrebom metode tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC). Lukovice su zamrznute u tečnom azotu, rastvoreni u 80% etanolu i podeljeni na tri frakcije u cilju razdvajanja šećera rastvorljivih u etanolu. Supernatant je uzet posle centrifugiranja od 15 min na 8000 g. Analiza šećera je urađena na Waters Breeze hromatografskom sistemu (Waters, Milford, MA) povezanom sa Waters 2465 elektrohemijским detektorom. Razdvajanje šećera vršeno je na CarboPac PA1 koloni (250 x 4 mm, Dionex, Sannzvale, CA) opremljene odgovarajućom CarboPac PA1 kolonom sa 0.2 M rastvorom NaOH kao mobilnom fazom. Šećeri su podvrgnuti izokratskoj eluciji tokom 20 min brzinom od 1.0 ml min⁻¹ na konstantnoj temperaturi od 30 °C. Signali su detektovani prema sledećim talasnim oblicima: E₁ = +0,05 V za 400 ms; E₂ = +0,75 V za 200 ms; E₃ = -0,15 V za 300 ms sa 180 ms vremena integracije. Svi standardi šećera dobijeni su od Sigma-e (Sigma Co., St. Louis, MO).

3.7. Određivanje sadržaja hlorofila i karotenoida u lukovicama

Za izolaciju hlorofila i karotenoida korišćeno je 20 mg biljnog materijala. Kao ekstrakciono sredstvo korišćen je 96 % etanol (2ml). Epruvete sa biljnim materijalom i etanolom zagrevane su u vodenom kupatilu na 70 °C tokom 10 minuta. Sadržaj hlorofila i karotenoida određivan je spektrofotometrijski na tri talasne dužine i beležena je vrednost absorbance (A): 470 nm, 648 nm, 664 nm prema Lichtenhaler (1987). Ukupna sadržaj hlorofila i karotenoida izračunavan je prema formuli i izražavan u mg/g sveže mase:

$$C_{(a+b)} = 5,24A_{664} + 22,24A_{648}$$

$$\text{Sadržaj hlorofila a: } C_a = 13,36A_{664} - 5,19A_{648}$$

$$\text{Sadržaj hlorofila b: } C_b = 27,43A_{648} - 8,12A_{664}$$

$$\text{Sadržaj karotenoida: } C = (1000A_{470} - 2,13C_a - 97,64C_b) / 209$$

Odnos hlorofila a i b izračunavan je prema formuli: C_a / C_b

Sve ekstrakcije ponovljene su po tri puta.

3.8. Analiza antioksidativnih enzima

Kvantifikacija aktivnosti SOD, CAT, POX i GR određena je spektrofotometrijski.

Razdvajanje izoenzima superoksid dismutaze rađeno je u poliakrilamidnom gelu nedenaturišućom elektroforezom (*Native PAGE*). Gelovi su fotografisani na transiluminatoru (UltraLum Inc, Gel Explorer-u, Exton, PA). Svi uzorci su analizirani tri puta. Analiza gelova grafički je obrađena primenom paketa TotalLab 120.

3.8.1. Izolacija i kvantifikacija ukupnih proteina

Ukupni rastvorljivi proteini izolovani su iz lukovica prosečne mase 500 mg, koje su homogenizovane u avanu sa tečnim azotom. U uzorke je dodat po 1 ml pufera za ekstrakciju proteina 0,1 M kalijum fosfati pufer (K-P pufer), pH 7, polivinilpirolidon (PVPP) 1,5%, 10 mM ditriotreitol (DTT), 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF). Nakon toga uzorci su prebačeni u ependorf tubice koje su stajale na ledu i centrifugirani na 12000 g 5 min na 4 °C. To je „*crude extract*“ koji sadrži rastvorljive ćelijske proteine. Izolati su čuvani na –80°C i dalje korišćeni za kvantifikaciju ukupnih proteina i enzimske testove. Za izolaciju esteraza korišćen je 0,2 M Tris-HCl pufer, pH 8. Kvantifikacija koncentracije proteina vršena je primenom Bradford metode (Bradford, 1976). Za ovu analizu pripremljena je smeša od 10 µl uzorka i 200 µl Bradfordovog reagensa. Merenje je rađeno spektrofotometru pri talasnoj dužini od 620 nm. Na osnovu standardne krive napravljene uz korišćenje BSA rastvora izračunata je koncentracija ukupnih proteina. Koncentracija ukupnih proteina u uzorku izražena je u odnosu na mg tkiva.

Bradfordov reagens:

1. Koncentrovana boja Comassie brilliant blue G-250 (CBB G-250)

komazi plavo (CBB) G-250	100 mg
95% etanol	50 ml
85% H ₃ PO ₄	100 ml
Voda	do 200 ml

2. Bradfordov reagens

CBB G-250	100 ml
Voda	do 500 ml

Standardni rastvor BSA: Pripremiti BSA rastvor sa vodom 10 mg/ml a zatim ga razblažiti do koncentracije od 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,7, 0,9, 1 mg/ml.

Uzorci proteina poznate (izmerene) koncentracije razblaženi su sa „*Loading buffer*“-om (za 10 ml pufera: 3 ml glicerola, 0,25% bromfenol plavo, 2,4 ml 1 M Tris Cl pH 6,8, 10 µl 1 M DTT i 4,59 ml vode) u odnosu 2:1 i nanošeni na poliakrilamidni gel.

3.8.2. Kvantifikacija aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze određivana je po modifikovanoj metodi Beyer i Fridovich-a (1987). Reakciona smeša (1 ml) sadržala je 100 mM K-P pufer (pH 7,8), 2 mM EDTA, 260 mM metionin, 1.5 mM nitroblu tetrazolium hlorid (NBT), 0,04 mM riboflavin (Tabela 6).

Tabela 6. Zapremine rastvora (μl) potrebne za pripremu 1 ml reakcione smeše.

K-P pufer (pH 7.8)	2 mM EDTA	260 mM metionin	uzorak	1.5 mM NBT	0.04 mM riboflavin
800	50	50	0	50	50
795	50	50	5	50	50
790	50	50	10	50	50
785	50	50	15	50	50
780	50	50	20	50	50
775	50	50	25	50	50

Za svaki uzorak pripremljeno je 6 razblaženja koja su naneta na mikrotitar ploču. Reakciona smeša je zatim osvetljavana tokom 30 min – 1 h na temperaturi od 25 °C u mikrotitar ploči. Merenje je vršeno na 540 nm. Aktivnost SOD određivana je kao količina uzorka potrebna za redukciju 50% supstrata (NBT) i izražava se kao U/mg. Sva merenja ponovljena su po tri puta

3.8.2.1. Detekcija aktivnosti superoksid dismutaze

Za razdvajanje izoformi SOD nenedeturišućom elektroforezom korišćen je poliakrilamidni gel koji sadrži „*Separating gel*“ 7% (za 10 ml gela: 2,35 ml akrilamida 30% i bisakrilamida 0,8%, 4,8 ml vode, 2,8 ml 1,5 M Tris-a pH 8,8, 2,5 μl tetrametiletilendiamin (TEMED) i 50 μl amonijum persulfata (APS) 10%) i „*Stracking gel*“ 5% (za 4,5 ml gela: 0,75 ml mix-a akrilamida 30% i bisakrilamida 0,8%, 2,83 ml vode, 0,875 ml 1 M Tris-a pH 8, 2 μl TEMED-a i 45 μl APS-a 10%). Debljina gela bila je 1,5 mm. Prilikom elektroforeze korišćen je „*Running buffer*“ (25 mM Tris, 192 mM glicin) pH 8,3. Detekcija aktivnosti enzima rađena je u tri ponavljanja. Metoda Beauchamp-a i Fridovich-a (1971) primenjavana je za razdvajanje izoenzima superoksid dizmutaze elektroforezom na 200 V, u trajanju od 6,5 h. Gelovi su ispirani vodom, pa inkubirani 30 min i to: prvi u 1 mM kalijum cijanida (KCN) u K-P puferu (inhibitor Cu/Zn-SOD izoformi), drugi u 5 mM H_2O_2 u K-P puferu

(inhibitor Cu/Zn-SOD i Fe-SOD izoformi), treći u K-P puferu (u kome su Cu/Zn-SOD, Fe-SOD i Mn-SOD izoforme aktivne). Nakon svi gelovi inkubirani su u reagensu (za 20 ml reagensa korišćeno 4,4 mg NBT, 0,6 mg riboflavina, 80 µl 250 mM etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), 4 µl TEMED-a i dopunjeno do 20 ml 100 mM K-P puferom pH 7,8 jedinica) 30 min, u mraku. Nakon ove inkubacije, gelovi su isprani vodom i osvetljavani su svetlošću neonske lampe do purpurno-ljubičaste boje. Na mestima aktivnosti SOD uočavale su se bezbojne trake. Pojava različitih SOD izoformi (Mn-SOD, Fe-SOD i Cu/Zn-SOD) konstatovana je poređenjem bezbojnih traka na ova tri gela. Gelovi su čuvani u rastvoru 50% glicerola.

3.8.3. Kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza

Aktivnost katalaza određivana je spektrofotometrijskim praćenjem kinetike nestajanja H₂O₂, prema metodi Aebi-a (1984). Korišćeni su 50 mM K-Na-P pufer pH 7,0 i 30% H₂O₂ sa apsorbancom od 0,85 ± 0,02. Aktivnost CAT je merena 3 min, na temperaturi od 20°C, na svakih 20 s. Jedinica (U) aktivnosti katalaza se definiše kao količina enzima koja razgradi 1 µmol H₂O₂ za 1 min. Aktivnost CAT (A) je izražena u U/ml (µmol H₂O₂ min⁻¹ml⁻¹) iracunavana je prema formuli (Aebi, 1984):

:

$$V_{\max} = (\Delta A - \Delta A_0) * V_k / 0.0436 * V_e$$

ΔA – promena apsorbance u minutu

ΔA_0 – promena apsorbance blank rastvora u minutu

V_k – zapremina reakcione smeše u kiveti (ml),

V_e – zapremina uzorka u kiveti (ml)

0,0436 – milimolarni ekstinkcioni koeficijent H₂O₂ na 240 nm izražen u mM⁻¹cm⁻¹

Sva merenja ponovljena su po tri puta

3.8.4. Kvantifikacija aktivnosti ukupnih peroksidaza

Aktivnost ukupnih peroksidaza ćelijskih proteina praćena je spektrofotometrijski merenjem promene apsorbance na 430 nm. Reakciona smeša je sadržala 2,9 ml 0,05 M K-P pufera, pH 6,5, 60 µl 1 M pirogalola (Sigma) kao supstrata za enzim i 10 µl uzorka, uz dodatak 30 µl 1 M H₂O₂ posle prvih 20 s reakcije. Aktivnost peroksidaza je merena 3 min, na svakih 20 s, a izražavana je u U/ml. Reakcija se dešava između supstrata pirogalola i H₂O₂, a katalizovana je peroksidazama i vodi do oksidacije pirogalola do purpurogalina koji je žućkasto-smeđe boje. Purpurogalin ima maksimum apsorpcije na 430 nm. Aktivnost enzima izračunavana je prema formuli (Kukavica i Veljović, 2004):

$$V_{\max} = (\Delta A - \Delta A_0) * V_k / 2.47 * V_e$$

ΔA – promena apsorbance u minutu,

ΔA_0 – promena apsorbance blank rastvora u minutu,

V_k – zapremina reakcione smeše u kiveti (ml),

V_e – zapremina uzorka u kiveti (ml),

2,47 – milimolarni ekstinkcioni koeficijent pirogalola na 430 nm i izražava se u mM⁻¹cm⁻¹.

Sva merenja ponovljena su po tri puta.

3.8.4.1. Zimografska detekcija peroksidaza

Za razdvajanje izoformi peroksidaza na gelu korišćen je poliakrilamidni gel koji sadrži 3,75 ml akril amida, 0,75 ml amfolita pH opsega 3-10, 4 ml glicerola, 6,5 ml vode, 12 µl TEMED-a, 75 µl APS. Izoforme peroksidaza su određene inkubiranjem gela 30 min u 50 mM M K-P puferu (pH 5,8) koji je sadržao gvajakol (10 µl gvajakola je resuspendovano u 10 ml 20 mM Tris pH 7,0) i 10 µl H₂O₂ (Siegel i Galston, 1967). Izoelektrično fokusiranje vršeno je na 10 °C na poliakrilamidnom gelu na koji je naneto 15 µl uzorka i 10 µl pI markera. Izoelektrično fokusiranje trajalo je tri sata na 1200 V, a korišćeni pH opseg bio je od 3-10. Analiza gelova rađena je primenom grafičkog paketa TotalLab TL 120.

3.8.5. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze

Spektrofotometrijska analiza aktivnosti glutation reduktaze rađena je po modifikovanoj metodi Carlberg i Mannervik-a (1985) praćenjem opadanja apsorbance na 340 nm zahvaljujući oksidaciji NADPH. Reakciona smeša sadržala je 1,5 ml, 0,1 M K-P pufera pH 7, 150 μ l 20 mM glutation disulfida (GSSH), 1 ml vode i 150 μ l 2 mM NADPH (rastvorenog u Tris-HCl puferu, pH 7). Finalna zapremina reakcione smeše u kiveti je bila 3 ml. Aktivnost se određuje kao količina enzima koji oksiduje 1 μ mol NADPH u minutu na 25 °C. Aktivnost enzima je izračunavana prema formuli:

$$V_{\max} = (\Delta A - \Delta A_0) * V_k / 6.2 * V_e$$

ΔA – promena apsorbance u min,

ΔA_0 – promena apsorbance blank rastvora u min,

V_k – zapremina reakcione smeše u kiveti (ml),

V_e – zapremina uzorka u kiveti (ml),

6,2 – milimolarni ekstinkcioni koeficijent NADPH na 340 nm izražen u $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Sva merenja ponovljena su po tri puta.

3.9. Zimografska detekcija esteraza

Za razdvajanje izoformi esteraza na gelu korišćen je poliakrilamidni gel koji sadrži 3,75 ml akril amida, 0,75 ml amfolita pH opsega 3-10, 4 ml glicerola, 6,5 ml vode, 12 μ l TEMED-a, 75 μ l APS. Za detekciju esteraza pripremljeni su supstrati za enzimsku aktivnost na sledeći način: 20 mg 1-naftil-acetata ili 2-naftil-acetata rastvoreno je u 2 ml 50% acetona i pomešano sa 100 ml 50 mM K-P pufera (pH 7,2). Za izoelektrično fokusiranje (IEF) korišćeno je 15 μ l uzorka. Gel je inkubiran 30 min na sobnoj temperaturi, a posle toga ispran vodom. 50 mg Fast Blue RR soli (Sigma) je rastvoreno u 10 ml vode i dodato u gel. Gel je inkubiran 25 min na 37 °C (Cheliak i Pitel, 1985). Ukoliko je gel

inkubiran sa samo jednim supstratom dobija se braon boja u slučaju 1-naftil-acetata, dok se u slučaju 2-naftil-acetata dobija roze boja.

3.10. Analiza arabinogalaktanskih proteina

3.10.1. Izolacija AGP

Arabinogalaktanski proteini izolovani su prema metodi van Holst-a i Clarke-a (1985; 1986). Eksplantati (300 mg) su sprášeni u tečnom azotu, a zatim je dodat pufer za ekstrakciju (1 ml) (Tabela 7)

Tabela 7. Ekstrakcioni pufer za izolaciju arabinogalaktanskih proteina (Holst i Clarke, 1985; 1986).

Komponenta	Količina
50 mM Tris – HCl, pH 8	100 ml
10 mM EDTA	0,2 g
1 M DTT	100 µl
1 % Triton X-100	1 ml

Posle ekstrakcije uzorci su sonifikovani tokom 1 min. Uzorci su posle sonifikacije inkubirani u frižideru tokom 24 h na temperaturi od 4-8 °C, a zatim centrifugirani 10 min na 4000 g, na 4 °C.

3.10.2. Određivanje koncentracije AGP

Koncentracija AGP u tkivu (segmenti lukovice i baze lista) je određivana radijalnom difuzijom prema metodi Popper-a (2011). Rastvor sa 1% agaroze, 0,15 M NaCl, 0,02 M Na₃ i 10 µg/ml Yariv reagensa je zagrevan do ključanja i razlivan na dve staklene pločice površine 5 x 7 cm (5 ml gela). U gelu debljine 1 mm prave se udubljenja prečnika 8 mm pomoću šireg dela Pasterove pipete. Udubljenja se ispunjavaju test-rastvorom (30 µl) serijskog razblaženja standardnog rastvora gumiarabike u opsegu od 0,0 do 1,0 mg/ml kako

bi se dobila standardna kriva. Pločice se ostavljaju preko noći u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi. Formirani crveni krugovi (Slika 6) su mereni pomoću milimetarskog papira i izračunavan im je kvadrat prečnika. Na osnovu standardne krive dobijene merenjem prečnika precipitacije gumiarabike kao standarda, određivana je koncentracija AGP u uzorku. Sva merenja ponovljena su po tri puta.



Slika 6. Određivanje koncentracije arabinogalaktanskih proteina radijalnom difuzijom sa standardnim rastućim koncentracijama gumiarabike

3.10.3. Određivanje kvalitativnih osobina AGP

AGP iz uzoraka analizirani su ukrštenom elektroforezom prema modifikovanoj metodi van Holst-a i Clarke-a (1986). Izolavani AGP su razvučeni na prvom gelu, a zatim prenošeni na drugi gel koji sadrži β -glukozil Yariv reagens. Osnovni rastvor za oba gela je isti i sadrži 1 % agarozu, 0,025 M Tris, 0,2 M glicin, pH 8,3. Prvi gel (30 ml) je zagrejan do ključanja i razliven u kadnicu 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 plavog (45 μ l), a drugi sa 100 μ l uzorka. Gelovi su izloženi naponu od 100 V tokom 1 h dok se boja ne pomeri 7 cm. Puffer koji je korišćen sadržao je 0,025 M Tris, 0,2 M glicin, pH 8,3. Posle prve elektroforeze isecan je segment gela dimenzija 1,5 x 7 cm i postavljan pod pravim uglom u odnosu na pravac prve elektroforeze.

Drugi gel sadrži 30 ml osnovnog rastvora sa dodatkom 30 μ g/ml Yariv reagens. Zagrevan je do ključanja, a zatim razlivan do ivice prvog gela. Drugi gel izložen je naponu

od 40 V tokom 5 sati. Gel je ostavljan tokom noći u 1 % rastvoru NaCl, a posle ispiran destilovanom vodom u cilju uklanjanja neprecipitiranog Yariv reagensa.

Prvi gel potapan je u 0,1 % β -glikozil Yariv reagens tokom 24 h u cilju dobijanja profila AGP koji su tokom prve elektroforeze razvučeni na gelu (Slika 7). AGP koji su na taj način raspoređeni na prvom gelu tokom druge elektroforeze prelaze na drugi gel pod uglom od 90°. Na mestima najveće koncentracije AGP na prvom gelu postiže se najveća precipitacija β -glikozil Yariv reagens na drugom gelu .

Analiza gelova i računanje Rf vrednosti rađeno je pomoću grafičkog paketa TotalLab TL120.



Slika 7. Profil gumiarabike dobijen na prvom agaroznom gelu potopljenom u 1% β -glikozil Yariv reagens tokom 24 h.

3.11. Statistička obrada podataka

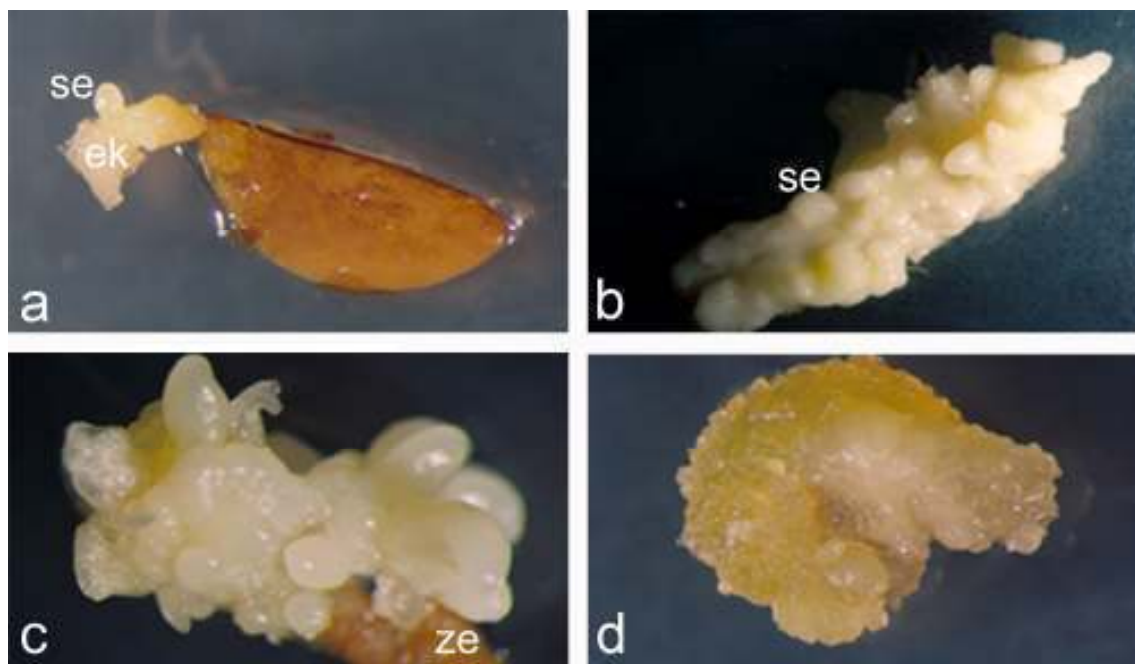
Numerički podaci su obrađeni primenom računarskog programa Statgraphics verzija 4.2 (STSC Inc. and Statistical Graphics Corporation, 1985-1989, USA). Za određivanje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti korišćena je analiza varijanse (ANOVA), kao i LSD („least significant difference“) test za utvrđivanje statistički značajnih razlika na nivou $p \leq 0.05$. Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je pomoću računarskog programa Microsoft Office Excel.

4. REZULTATI

4.1. Kultura zrelih zigotskih embriona *Fritillaria meleagris* L.

4.1.1. Indukcija morfogeneze *in vitro* u kulturi zrelih zigotskih embriona

Izolovani zigotski embrioni *F. meleagris* L. gajeni su na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja i pet MS hranljivih podloga obogaćenih regulatorima rastenja (2,4-D, 2,4-D+KIN, BAP, IAA+BAP ili TDZ, 1 mg/l svaki) u cilju indukcije morfogeneze *in vitro* (Slika 8).



Slika 8. Indukcija morfogeneze *in vitro* u kulturi zrelih zigotskih embriona *F. meleagris* L. a, b) embriogeni kalus (ek) sa globularnim somatskim embrionom (se) formiran na zigotskom embrionu na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja c) diferencijacija somatskih embriona na hranljivoj podlozi sa TDZ 1 mg/l (ze-zigotski embrion) d) bledo zeleni ne-embriogeni kalus formiran posle mesec dana gajenja na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN 1 mg/l, svaki.

Posle dve nedelje gajenja u kulturi uočavaju se prve morfogenetske promene na zigotskim embrionima. Eksplantati se izdužuju, uvećavaju i dolazi do pojave kalusa.

Posle mesec dana gajenja, na hranljivoj podlozi bez regulatora rasteenja u proksimalnom delu zigotskih embriona formira se embriogeni kalus na kome se diferenciraju somatski embrioni (Slika 8 a i b). Indukcija somatske embriogeneze na ovoj podlozi iznosila je 23,32 %. Somatska embriogeneza indukovana je i kod zigotskih embriona gajenih na hranljivoj podlozi sa TDZ 1 mg/l (Tabela 8). Posle mesec dana gajenja, na ovoj hranljivoj podlozi formiran je embriogeni kalus (46 %) sa somatskim embrionima (Slika 8 c). Zigotski embrioni koji su gajeni na ostalim hranljivim podlogama kalusiraju celom dužinom. Formirani kalus je neembriogeni, rastresit, zelene do braon boje i nekrozira posle dve do tri nedelje gajenja u kulturi (Slika 8 d).

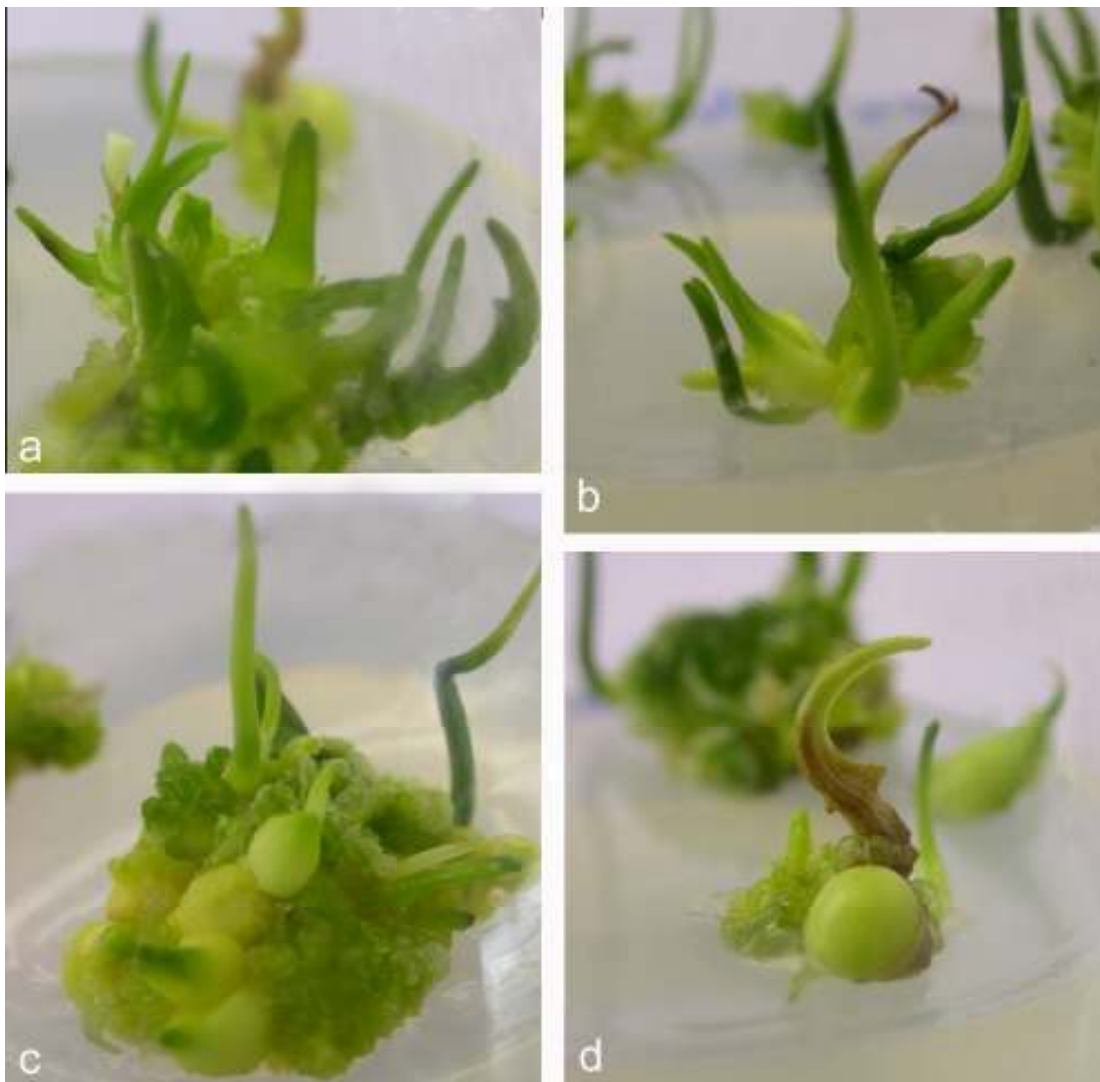
Zigotski embrioni kod kojih je indukovana morfogeneza *in vitro* dalje su gajeni na hranljivim podlogama bez regulatora rasteenja ili sa TDZ (1 mg/l) sledećih mesec dana. Pored indukcije somatske embriogeneze, na obe hranljive podloge indukovana je i organogeneza i formiran je veliki broj adventivnih izdanaka (Slika 9 a, b). Daljim gajenjem na istoj hranljivoj podlozi izdanci se umnožavaju i razvijaju lukovice (Slika 9, c, d; Tabela 8).

Na hranljivoj podlozi obogaćenoj sa TDZ formira se statistički veći broj lukovica (oko 4) u odnosu na hranljivu podlogu bez regulatora rasteenja, na kojoj dolazi do spontanog formiranja malog broja lukovica (Tabela 8).

Tabela 8 . Uticaj različitih hranljivih podloga na indukciju morfogeneze *F. meleagris* L.

Hranljiva podloga	Indukcija (%)	Prosečan broj	
		somatski embrioni	lukovice
MS	23,32	6,22 ± 0,98 ^a	1,05 ± 0,12 ^a
MS+TDZ	46,00	4,73 ± 0,95 ^{ab}	3,70 ± 0,90 ^b

vrednosti su izražene kao prosečna vrednost ± standardna greška, ista slova u eksponentu označavaju da nema statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti na osnovu LSD testa.



Slika 9. Indukcija adventivnih izdanaka i formiranje lukovica u kulturi zrelih zigotskih embriona *F. meleagris*. a) i b) formiranje izdanaka na kalusu gajenom na MS hranljivoj podlozi sa TDZ (1 mg/l); c) i d) formiranje lukovica na istoj hranljivoj podlozi.

4.1.2. Uticaj niske temperature (4 °C) na rasteenje i razviće *in vitro* formiranih lukovica

Lukovice formirane na hranljivoj podlozi sa TDZ 1 mg/l (Slika 10 a) su dalje pojedinačno gajene na hranljivoj podlozi bez regulatora rasteenja radi ispitivanja njihovog daljeg rasteenja i razvića. Pojedinačne lukovice (Slika 10 b) su gajene na standardnoj

temperaturi gajenja u uslovima *in vitro* (24 °C) ili niskoj temperaturi (4 °C) u trajanju od 6 nedelja.



Slika 10. Uticaj niske temperature na ožiljavanje i umožavanje lukovica: a) lukovice formirane na hranljivoj podlozi sa TDZ; b), c), d) lukovice na različitom stadijumu razvića tokom hlađenja na 4 °C; e) i f) umožavanje lukovica (e) i dalje razviće (f) lukovica posle 4 nedelje gajenja u standardnim uslovima; g) kompletno formirana biljčica *F. meleagris* iz lukovice

Nakon 6 nedelja, 60,4 % lukovica gajenih na 4 °C se ožililo (Slika 10 b, c, d), dok je 32,4 % lukovica gajenih na standardnoj temperaturi formiralo korenove (Tabela 9). Kod lukovica gajenih na 4 °C, broj formiranih korenova i dužina najdužeg korena su statistički značajno veći u odnosu na lukovice gajene na temperaturi od 24 °C. Nije uočena statistički

značajna razlika u dužini nadzemnog dela biljke na različitim temperaturnim tretmanima (Tabela 9).

Tabela 9. Uticaj niske temperature (4 °C) u trajanju od 6 nedelja na rastenje i ožiljavanje lukovica *F.meleagris* L.

Tretman (°C)	Ožiljavanje (%)	Dužina biljke (mm)	Korenovi	
			Broj	Dužina (mm)
24	32.4	20,31 ± 1,41 ^a	1,49 ± 0,10 ^a	4,96 ± 0,42 ^a
4	60.4	24,54 ± 1,61 ^a	2,01 ± 0,14 ^b	8,49 ± 0,75 ^b

vrednosti su izražene kao prosečna vrednost ± standardna greška, ista slova u eksponentu označavaju da nema statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti na osnovu LSD testa.

Produženim gajenjem lukovica u trajanju od 4 nedelje na standardnoj temperaturi, bez obzira na to kojoj su temperaturi u predhodnoj subkulturi gajene, došlo je do potpunog razvića biljaka (Slika 10 g). Kompletно razvijene biljke koje su kontinuirano gajene 10 nedelja na 24 °C su pokazale statistički značajne razlike u pogledu dužine biljka u odnosu na biljke koje su dobijene od lukovica gajenih 6 nedelja na 4 °C (Tabela 10). Prosečna dužina biljaka dobijenih posle tretmana hlađenja je bila za 42,92 % veća (Slika 10 e,f) u odnosu na dužinu biljaka koje su kontinualno gajene na 24 °C.

Tabela 10. Efekat pretretmana niskom temperaturom (4 °C) na rastenje i razviće lukovica *F. meleagris* L. *in vitro*.

Tretman (°C)	Dužina biljke (mm)	Korenovi	
		Broj	Dužina (mm)
24 (10 nedelja)	39,93 ± 5,45 ^a	2,7 ± 0,62 ^a	15,81 ± 2,68 ^a
4 (6 nedelja) + 24 (4 nedelje)	57,07 ± 6,16 ^b	3,03 ± 0,94 ^a	20,11 ± 4,12 ^{ab}

vrednosti su izražene kao prosečna vrednost ± standardna greška, ista slova u eksponentu označavaju da nema statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti na osnovu LSD testa.

Značajna razlika je uočena i u prosečnoj dužini korena. Prosečna dužina najdužeg korena je bila veća za 27,19 % u odnosu na biljke koje nisu gajene na niskoj temperaturi.

4.1.3. Uticaj niske temperature (4 °C) na sadržaj vode, rastvorljivih šećera, poliola i fotosintetičkih pigmenata u lukovicama *F. meleagris* formiranim *in vitro*

Kod ožiljenih lukovica koje su gajene na dve temperature (24 i 4 °C) određen je sadržaj vode, šećera, poliola i fotosintetičkih pigmenata. Nakon 6 nedelja u kulturi, na temperaturi od 4 °C uočen je za 13 % povećan sadržaj vode u odnosu na lukovice koje su gajene na standardnoj temperaturi. Pored toga, zapaženo je povećanje koncentracije glukoze i fruktoze (Tabela 11). U lukovicama koje su gajene na 4 °C uočena je značajna akumulacija fruktoze čija je koncentracija 3,5 puta veća u odnosu na one lukovice koje su gajene na 24 °C. Sadržaj poliola u lukovicama gajenim na 4 °C je takođe bio povećan 2,2 puta.

Tabela 11. Sadržaj vode, ugljenih hidrata i poliola u lukovicama *F. meleagris* L. gajenim na 4 i 24 °C *in vitro*.

Tretman (°C)	Voda (%)	Ugljeni hidrati (mmol/100 g suve mase)			polioli
		saharoza	glukoza	fruktoza	
24	77,64	30,42 ± 1,47	3,54 ± 0,39	2,18 ± 0,18	0,64 ± 0,17
4	90,67	32,01 ± 2,11	4,78 ± 0,77	7,73 ± 1,17	1,46 ± 0,16

vrednosti su izražene kao prosečna vrednost ± standardna greška

Analiza fotosintetičkih pigmenata pokazala je da kod lukovica gajenih 6 nedelja na temperaturi od 4 °C dolazi do smanjenja koncentracije hlorofila, dok je koncentracija karotenoida povećana u odnosu na lukovice gajene konstantno na 24 °C. Sadržaj ukupnih pigmenata kao i relativni odnos hlorofila a i b značajno se smanjuju tokom perioda hlađenja (Tabela 12).

Uporedo je određen sadržaj fotosintetičkih pigmenata kod lukovica koje su posle tretmana niskom temperaturom nedelju dana gajene na standardnoj temperaturi. Kod njih se povećava količina hlorofila, a smanjuje količina karotenoida u odnosu na lukovice koje su izlagane niskoj temperaturi tokom 6 nedelja.

Tabela 12. Uticaj niske temperature (4 °C) u trajanju od 6 nedelja na sadržaj hlorofila i karotenoida *F. meleagris* (vrednosti izražene u mg/g sveže mase).

Tretman (°C)	Hlorofili (<i>Chl</i>)			Karotenoidi	Ukupni fotosintetički pigmenti
	<i>Chla</i>	<i>Chlb</i>	<i>Chla/Chlb</i>		
24	0,218±0,01 ^c	0,418±0,03 ^c	0,535 ^b	0,034±0,01 ^a	0,677±0,04 ^c
4 (6 nedelja)	0,029±0,02 ^a	0,067±0,03 ^a	0,339 ^a	0,072±0,01 ^b	0,169±0,05 ^a
4 (6 nedelja) + 24 (1 nedelja)	0,140±0,01 ^b	0,264±0,03 ^b	0,535 ^b	0,036±0,01 ^{ab}	0,444±0,04 ^b

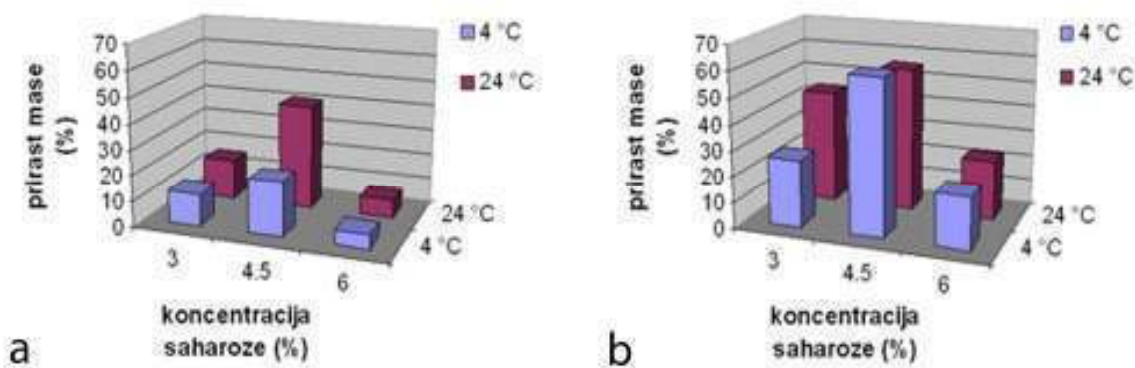
vrednosti su izražene kao prosečna vrednost ± standardna greška, ista slova u eksponentu označavaju da nema statistički značajnih razlika (za $p \leq 0,05$) između srednjih vrednosti na osnovu LSD testa.

4.1.4. Uticaj povećane koncentracije saharoze na rastenje lukovica formiranih *in vitro*

Proučavan je uticaj različitih koncentracija saharoze (3, 4,5 i 6 %) na rastenje lukovica formiranih *in vitro* na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rasteња. Lukovice su gajene na standardnoj (24 °C) ili niskoj temperaturi (4 °C) tokom prve 4 nedelje, a zatim su sve gajene još 4 nedelje na standardnoj temperaturi. Promene prirasta mase praćene su posle 4 (Slika 11 a) i posle 8 nedelja (Slika 11 b).

Najveći prirast mase biljka uočava se gajenjem lukovica na podlozi sa 4,5 % saharoze. Na ovoj koncentraciji saharoze lukovice gajene na temperaturi od 4 °C su imale prirast mase od 21,04%, dok je kod onih koje su gajene na standardnoj temperaturi prirast mase bio 40,96% (Slika 11 a).

Prirast mase lukovica posle još 4 nedelje gajenja na standardnoj temperaturi (ukupno 8 nedelja u kulturi) prikazan je na Slici 11 b. Najveći prirast mase primećen je kod lukovica koje su gajene na hranljivoj podlozi sa 4,5% saharoze i koje su prethodno mesec dana gajene na temperaturi od 4 °C (60,16%).

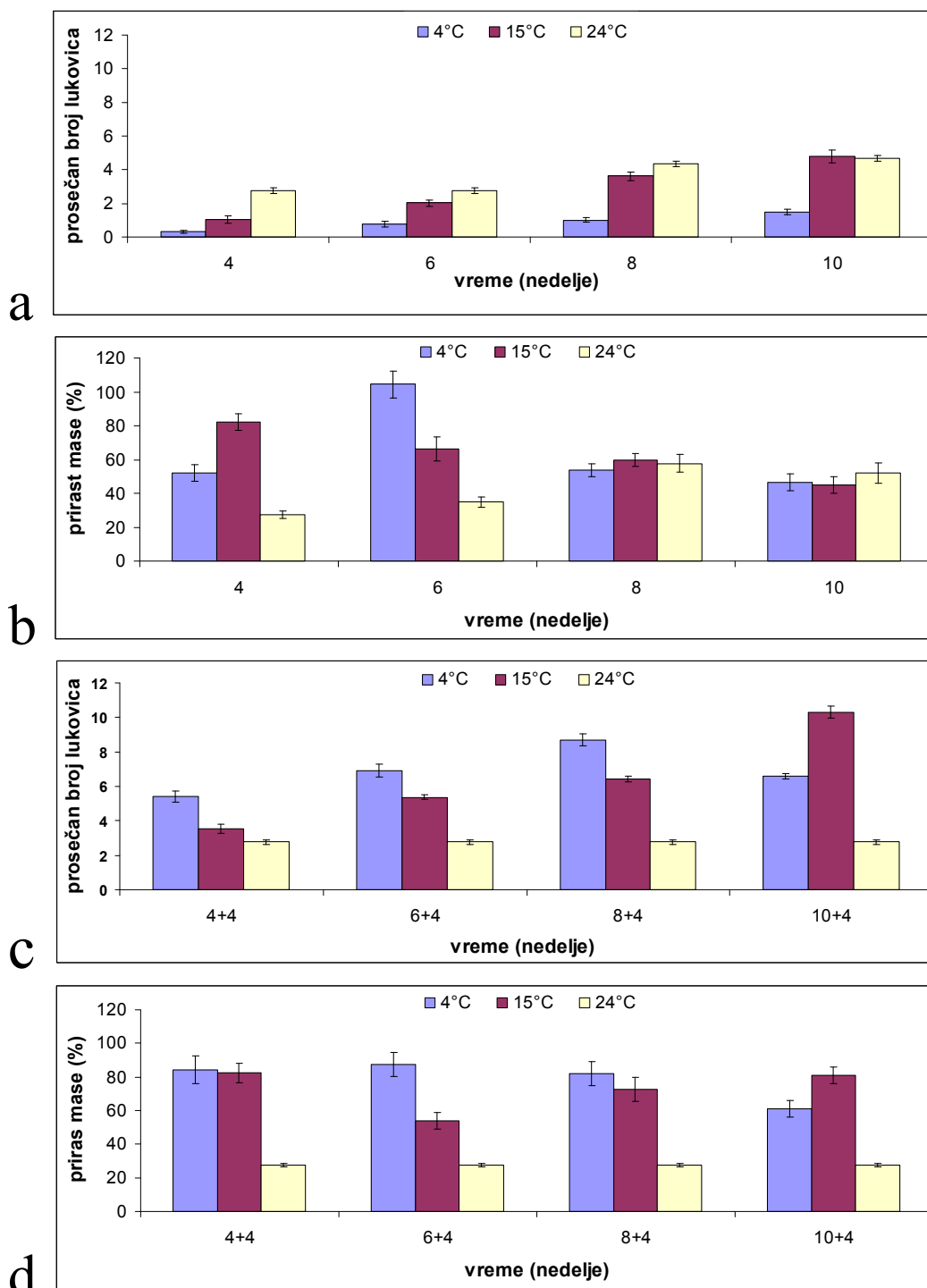


Slika 11. Uticaj povećane koncentracije saharoze na prirast mase (%) lukovica *F. meleagris* L. a) prirast mase lukovica posle 4 nedelje gajenja na 4 odnosno 24 °C; b) prirast mase lukovica koje su gajene još 4 nedelje na 24 °C (ukupno 8 nedelja u kulturi).

Iz ovih rezultata može se videti da blago povećana koncentracija saharoze u hranljivoj podlozi (4,5%) u kombinaciji sa gajenjem lukovica na sniženoj temperaturi pozitivno utiče na povećanje prirasta mase lukovica *F. meleagris*. Koncentracija saharoze od 6% u hranljivoj podlozi dovodi do smanjenog prirasta mase na obe temperature.

4.1.5 Uticaj temperature i dužine gajenja na umnožavanje i rastenje lukovica

U daljim eksperimentima praćen je uticaj dve temperature (4 i 15 °C) na umnožavanje i rastenje lukovica tokom perioda od 4, 6, 8 i 10 nedelja gajenja u mraku. Kontrolne lukovice gajene su na standardnoj temperaturi (24 °C) u kulturi. Broj i prirast mase novoformiranih lukovica prikazani su na Slici 12 (a i b). Lukovice gajene na temperaturi od 4 °C nisu se umnožavale, dok na temperaturi od 15 i 24 °C dolazi do



Slika 12. Uticaj temperature (4 i 15 °C) i dužine gajenja (4-10 nedelja) na umnožavanje lukovica (a) i prirast mase lukovica (b) tokom tretmana niskim temperaturama i posle četiri nedelje (+ 4) gajenja na standardnoj temperaturi (c i d).

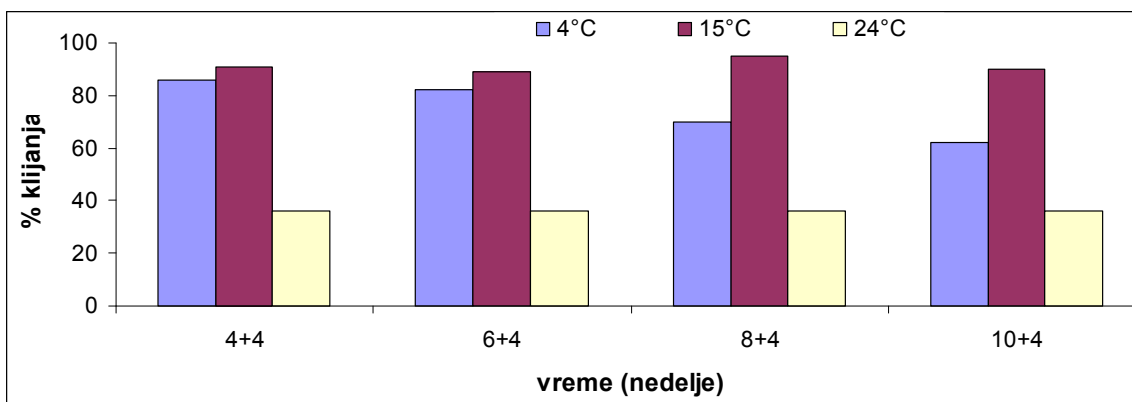
povećanja broja novoformiranih lukovica (Slika 12 a). Najveći prosečan broj lukovica (4,8) dobijen je kada su one gajene 10 nedelja na 15 °C. Tokom istog perioda gajenja u kulturi na 4 °C regenerisan je znatno manji (1,5) prosečan broj lukovica (Slika 12 a).

Temperatura i dužina gajenja uticali su i na prirast mase novoformiranih lukovica u kulturi (Slika 12 b). Kod lukovica koje su gajene na nižim (4 i 15°C) temperaturama u periodu od 6 nedelja uočava se povećanje procenta prirasta mase u odnosu na kontrolne kulture gajene na 24 °C. Najveći prirast mase lukovica (104,6%) uočen je u kulturama koje su gajene 6 nedelja na 4 °C. Kod lukovica gajenih na 15 °C zabeležen je trend značajnog smanjenja prirasta mase njihovim produženim gajenjem na ovoj temperaturi. Najveći prirast mase lukovica gajenih na 15 °C je zabeležen posle 4 nedelje gajenja i iznosi 80 %, dok je najmanji bio 45% i to posle 10 nedelja gajenja (Slika 12 b).

Sve lukovice dalje su gajene *in vitro* još 4 nedelje na standardnoj temperaturi (24 °C). Posle ovog perioda praćeni su sledeći parametri: prosečan broj lukovica (Slika 12 c), prirast mase lukovica (Slika 12 d) i procenat klijanja lukovica (Slika 13). Gajenje lukovica na niskim temperaturama dovelo je do povećanja broja novoformiranih lukovica (Slika 10 e). Iz rezultata prikazanih na Slici 12 c može se videti da se prethodnim gajenjem na nižim temperaturama (4 i 15 °C) podstiče umnožavanje lukovica. Najveći broj lukovica prethodno gajenih na 4 °C tokom 8 nedelja iznosio je 8,7 što je skoro 8 puta više od broja lukovica regenerisanih tokom perioda hlađenja. Period hlađenja od 10 nedelja na 4 °C, nepovoljno utiče na prosečan broj lukovica.

Lukovice koje su gajene 10 nedelja na 15 °C su pokazale najveći morfogenetški potencijal tako da je broj novoformiranih iznosio 10,3 lukovica.

Pored toga, gajenje lukovica na niskim temperaturama utiče i na prirast mase (Slika 12 d). Najveći prirast mase (87,42%) zabeležen je posle 6 nedelja gajenja lukovica na 4 °C. Tretman od 10 nedelja gajenja lukovica na 4 °C, nepovoljno utiče na prirast mase lukovica (Slika 12 d).

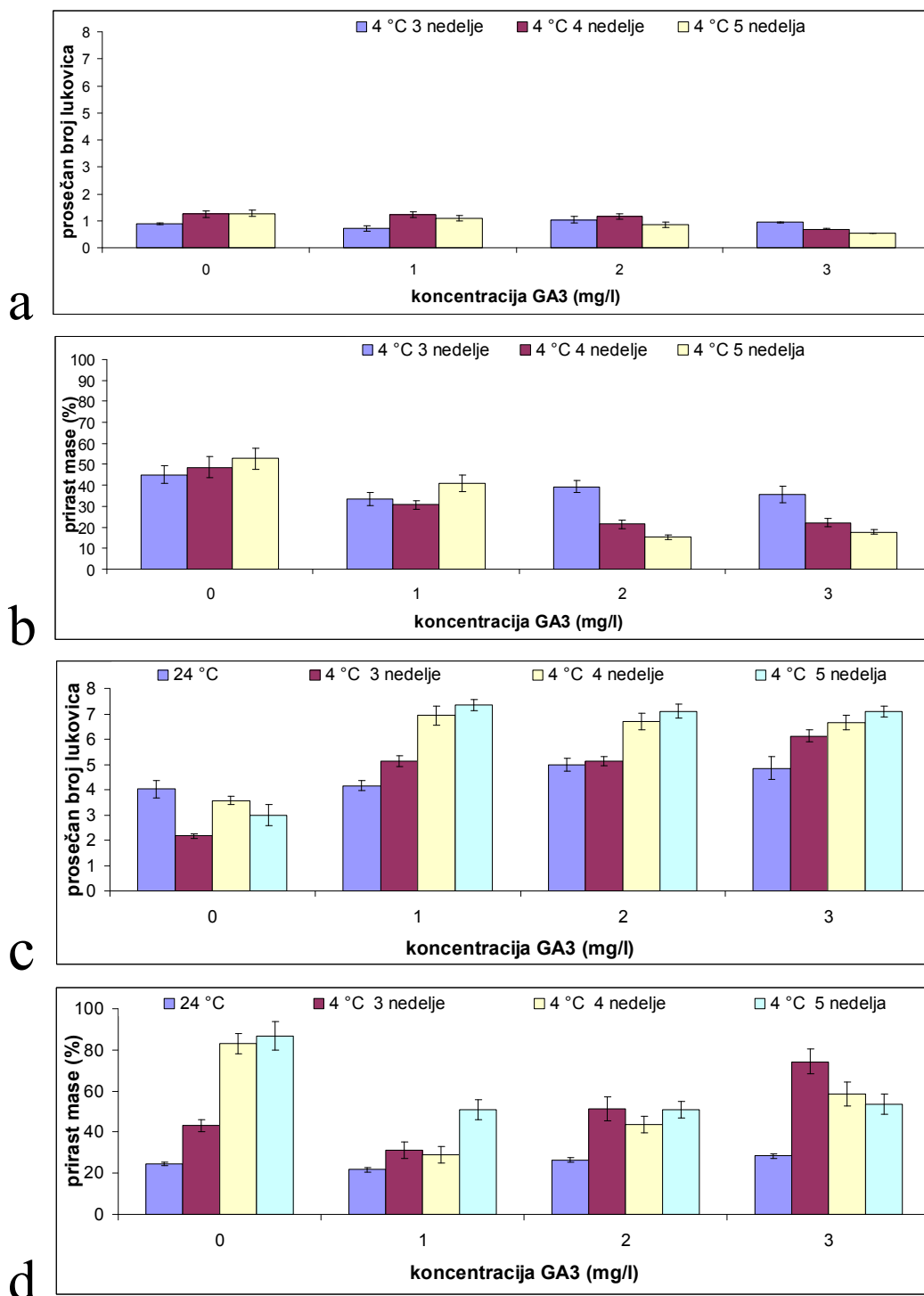


Slika 13. Uticaj temperature i dužine gajenja (4-10 nedelja) na klijanje *in vitro* lukovica *F. meleagris* posle četiri nedelje (+ 4) gajenja na standardnoj temperaturi.

Gajenje lukovica na nižim temperaturama (4 i 15 °C) imalo je pozitivan uticaj i na njihovo klijanje u odnosu na one koje su konstantno gajene na standardnoj temperaturi (Slika 13). Pretretman gajenja lukovica na 4 °C dovodi do smanjenja procenta klijanja lukovica. Tako gajenje lukovica 10 nedelja na 4 °C dovodi do smanjenja procenta klijanja za 20 % u odnosu na one koje su gajene na toj temperaturi 4 nedelje.

4.1.6. Uticaj GA₃ na rastenje i razviće lukovica gajenih na 4 °C

Lukovice formirane *in vitro* na 24 °C su gajene na temperaturi od 4 °C, tokom 3, 4 ili 5 nedelja u mraku. Pred početak subkulture one su bile tretirane rastvorom GA₃ koncentracije 1, 2 ili 3 mg/l tokom 24 h. U ovim eksperimentima praćeni su sledeći parametri: broj novoformiranih lukovica i prirast mase (Slika 14 a i b).



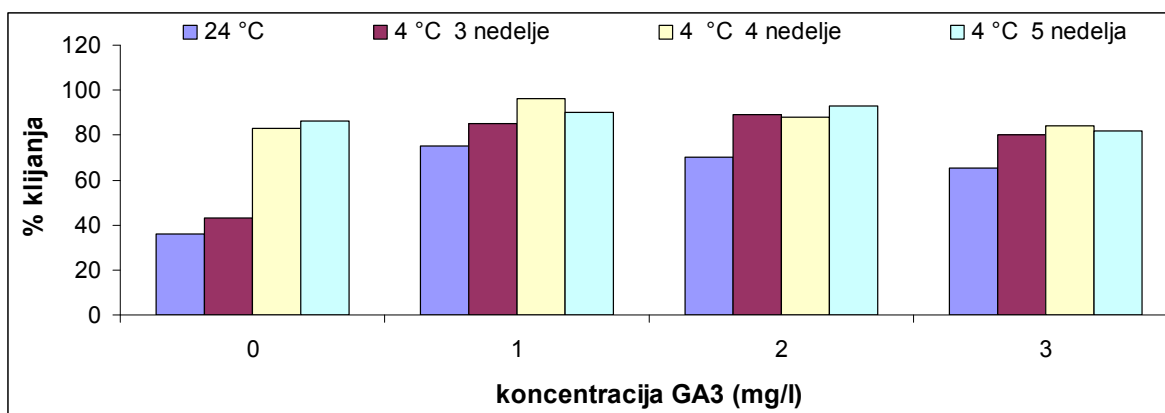
Slika 14. Uticaj pretretmana giberelnom kiselinom na umnožavanje lukovica (a) i prirast mase lukovica (b) tokom tretmana niskim temperaturama (3-5 nedelja) i posle četiri nedelje gajenja na standardnoj temperaturi (c i d).

Pretretmanom sa GA₃ formira se manji broj lukovica u odnosu na kontrolne (Slika 14 a). Pored efekta na umnožavanje lukovica, GA₃ negativno utiče na prirast mase (Slika 14 b).

Sve lukovice koje su gajene na 4 °C i tretirane različitim koncentracijama GA₃ dalje su gajene na standardnoj temperaturi naredne 4 nedelje. Posle tog perioda određivani su im sledeći parametri: prosečan broj lukovica (Slika 14 c), prirast mase (Slika 14 d) i procenat klijanja lukovica (Slika 15).

Pretretman sa GA₃ pozitivno utiče na broj novoformiranih lukovica u odnosu na kontrolne lukovice koje nisu tretirane pomenutim regulatorom rasteња (Slika 14 c). Gajenje lukovica na temperaturi od 4 °C uz pretretman svim koncentracijama GA₃ ima pozitivan uticaj na njihovo umnožavanje. Najveći broj regenerisanih lukovica (~7) formirao se perioda posle gajenja od 5 nedelja i pretretmana sa 1 mg/l GA₃ (Slika 14 c).

Pretretman sa GA₃ nema uticaja na prirast mase lukovica gajenih pri standardnim uslovima (Slika 14 d), međutim ima efekat kod onih gajenih na 4 °C. Sa povećanjem koncentracije GA₃ u pretretmanu povećava se prirast mase lukovica gajenih na 4 °C (Slika 14 d). U odnosu na lukovice koje nisu tretirane giberelinom, efekat GA₃ na prirast mase zavisi od dužine gajenja na 4 °C.



Slika 15. Uticaj pretretmana giberelnom kiselinom na klijanje lukovica *F. meleagris* *in vitro*

GA₃ ima pozitivan efekat na klijanje lukovica koje predhodno nisu gajene na temperaturi od 4 °C (Slika 15). Postoji zavisnost efekta pretretmana sa GA₃ i dužine gajenja lukovica na niskoj temperaturi na klijanje lukovica. Lukovice koje su isključale u standardnim uslovima gajenja u kulturi ne nastavljaju sa daljim rastom u odnosu na one koje su gajene na temperaturi od 4 °C .

4.1.7. Aklimatizacija biljaka

Kompletno formirane biljke *F. meleagris* (Slika 16 a) gajene su u uslovima staklenika u cilju aklimatizacije na *ex vitro* uslove. Ukupno je posađeno 64 biljke od kojih je 30 uspešno aklimatizovano tako da je ukupan procenat aklimatizacije iznosio 46,8 % (Slika b-d).



Slika 16. Aklimatizacija *in vitro* regenerisanih biljka *F. meleagris* L. na *ex vitro* uslove a) kompletno formirana biljka iz kulture *in vitro* pre sadenja; b), c), d) biljke aklimatizovane na *ex vitro* uslove.

Od ukupnog broja biljaka koje su gajene na 4 °C, uspešno je aklimatizovano 50,9 % dok je taj broj kod biljaka gajenih na standardnim uslovima iznosio 30,7 %. Ovi rezultati ukazuju da *in vitro* gajenje lukovica na niskoj temperaturi (4 °C) povoljno utiče na proces njihove aklimatizacije.

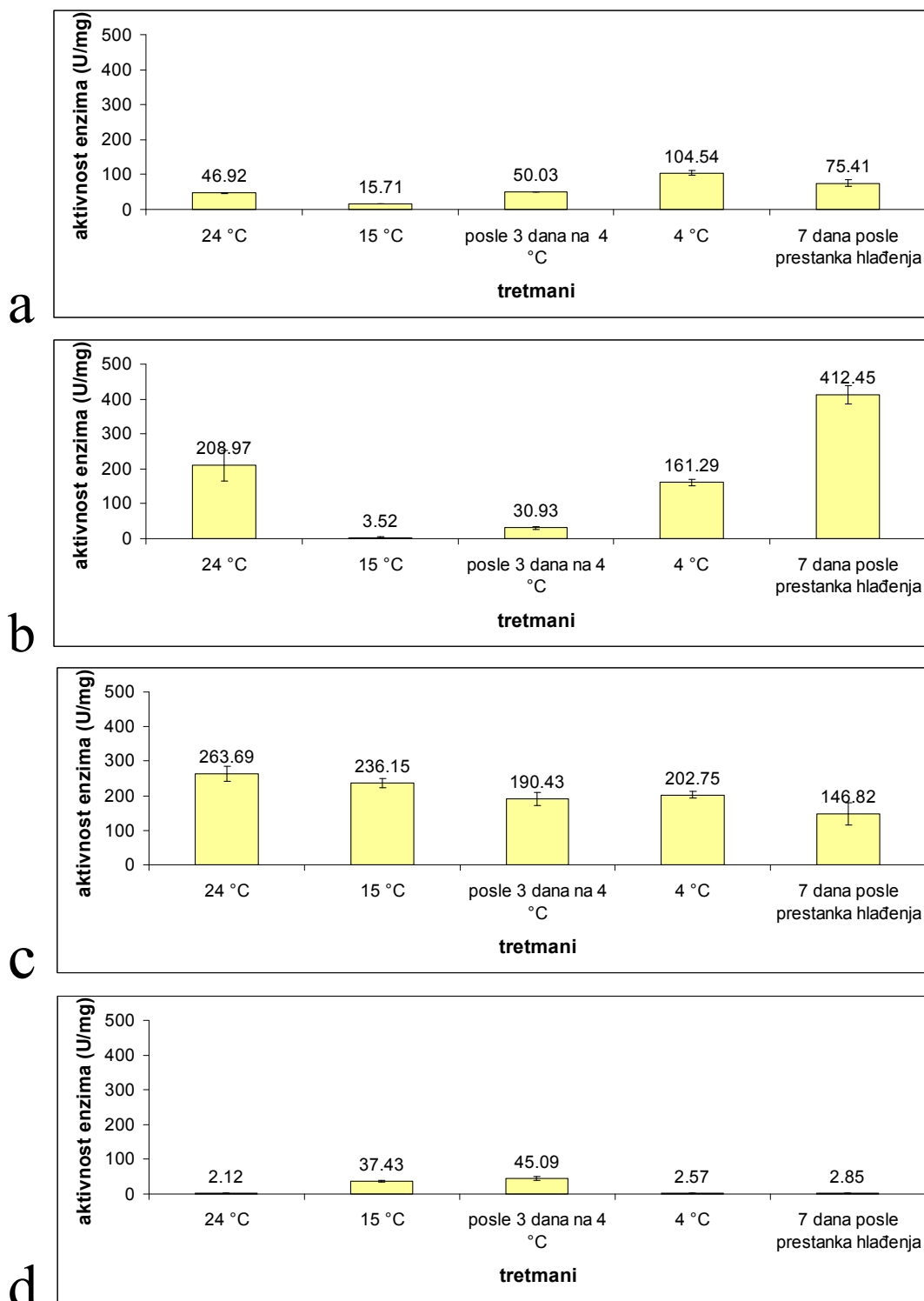
4.2. Biohemijski aspekti razvika lukovica *F. meleagris* L .

Aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GR i POX) praćena je u lukovicama *F. meleagris* koje su gajene *in vitro* na različitim temperaturama, kao i onih koje su gajene u uslovima spoljašnje sredine (*ex vitro*).

4.2.1. Aktivnost antioksidativnih enzima kod lukovica gajenih *in vitro*

Aktivnost antioksidativnih enzima određena je kod lukovica gajenih na 3 temperature (24, 15 i 4 °C) tokom 8 nedelja. Pored toga, praćena je njihova aktivnost na početku izlaganja najnižoj temperaturi, u trajanju od 3 dana, kao i 7 dana posle završenog izlaganja ovoj temperaturi. Rezultati su prikazani na Slici 17.

Aktivnost SOD kod lukovica koje su kontinualno gajene *in vitro* na 24 °C iznosila je $46,92 \pm 0,55 \mu\text{molmin}^{-1}$. Kada su lukovice gajene na 15 °C zabeležena je najmanja aktivnost enzima i iznosila je $15,70 \pm 0,14 \mu\text{molmin}^{-1}$. Kod lukovica gajenih na 4 °C tokom istog vremenskog perioda uočena je povećana aktivnosti SOD, i to 7 puta veća nego kod lukovica gajenih na 15 °C. Povećanje aktivnosti SOD se uočava već posle 3 dana gajenja na 4 °C i iznosi $50,030 \pm 0,009 \mu\text{molmin}^{-1}$. Pad aktivnosti SOD uočava se kod lukovica 7 dana posle prestanka izlaganja niskoj temperaturi, gajenih na 24 °C posle predhodnog izlaganja niskoj temperaturi u trajanju od 8 nedelja (Slika 17 a).



Slika 17. Aktivnost antioksidativnih enzima u lukovicama tokom gajenja *in vitro* a) superoksid dismutaze b) katalaze c) glutation reduktaze d) peroksidaza.

Aktivnost katalaza smanjuje se sa snižavanjem temperature na kojoj se gaje lukovice (Slika 17 b). Lukovice konstantno gajene na 24 °C imale su relativno visoku aktivnost katalaza koja iznosi $208,97 \pm 44,69 \mu\text{molmin}^{-1}$, dok su lukovice gajene na 15 °C pokazivale najmanju aktivnost ($3,52 \pm 0,88 \mu\text{molmin}^{-1}$). Najveća aktivnost katalaza zabeležena je kod lukovica nedelju dana posle prestanka gajenja na 4 °C i iznosila je $412,45 \pm 26,75 \mu\text{molmin}^{-1}$.

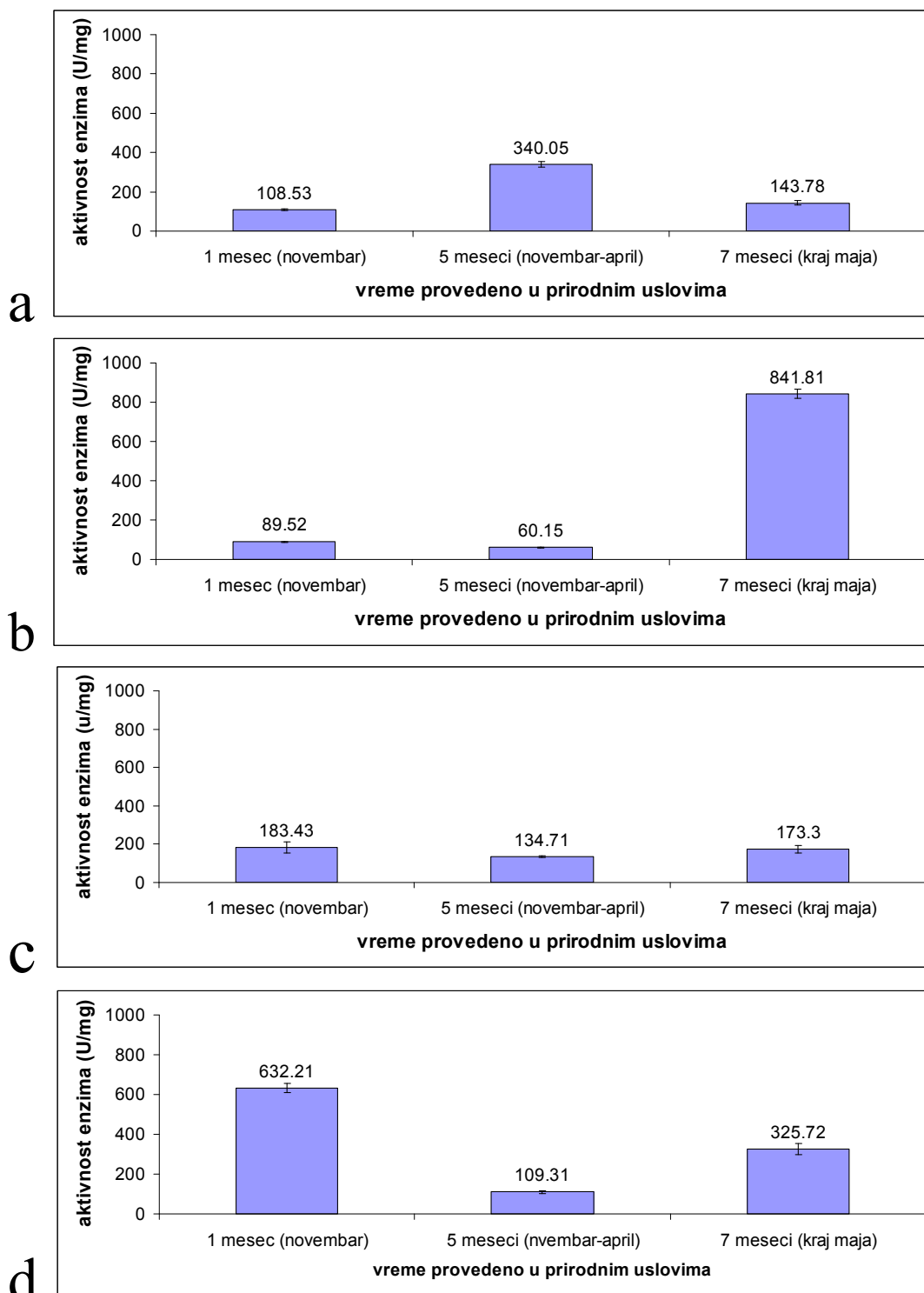
Aktivnost glutathion reduktaze se smanjuje kada se lukovice gaje na nižim temperaturama i to proporcionalno sa sniženjem temperature. Najveća aktivnost glutathion reduktaze zabeležena je kod lukovica gajenih na 24 °C ($263,69 \pm 21,20 \mu\text{molmin}^{-1}$), dok je nešto manja kod lukovica gajenih na 15 °C ($236,15 \pm 14,37 \mu\text{molmin}^{-1}$). Najmanja aktivnost glutathion reduktaze zabeležena je 7 dana posle prestanka izlaganja temperaturi od 4 °C i iznosi $146,82 \pm 32,42 \mu\text{molmin}^{-1}$ (Slika 17 c).

Lukovice *F. meleagris* gajene *in vitro* pri standardnoj temperaturi (24 °C) pokazuju namanju aktivnost ukupnih peroksidaza ($2,12 \pm 0,69 \mu\text{molmin}^{-1}$). Mnogo veća aktivnost peroksidaza izmerena je u lukovicama gajenim na 15 °C ($37,43 \pm 2,17 \mu\text{molmin}^{-1}$). Povećana aktivnost peroksidaza je uočena posle 3 dana gajenja lukovica na 4 °C (više od 20 puta), dok je njihova aktivnost niska posle 8 nedelja gajenja na ovoj temperaturi, kao i 7 dana posle završenog perioda gajenja na niskoj temperaturi (Slika 17 d).

4.2.2. Aktivnost antioksidativnih enzima kod lukovica gajenih *ex vitro*

Aktivnost antioksidativnih enzima određena je kod lukovica gajenih 1, 5 i 7 meseci u uslovima spoljašnje sredine. Analiza antioksidativnih enzima urađena je krajem novembra, marta i maja (Slika 18).

Porast aktivnosti SOD primećuje se već posle mesec dana gajenja u prirodnim uslovima, krajem novembra, kada iznosila $108,53 \pm 3,17 \mu\text{molmin}^{-1}$. Najveća aktivnost SOD ($340,05 \pm 15,11 \mu\text{molmin}^{-1}$) bila je kod lukovica koje su tokom 5 zimskih meseci gajene *ex vitro* (Slika 18 a).



Slika 18. Aktivnost antioksidativnih enzima u lukovicama tokom gajenja *ex vitro* a) superoksid dismutaze b) katalaze c) glutation reduktaze d) peroksidaza.

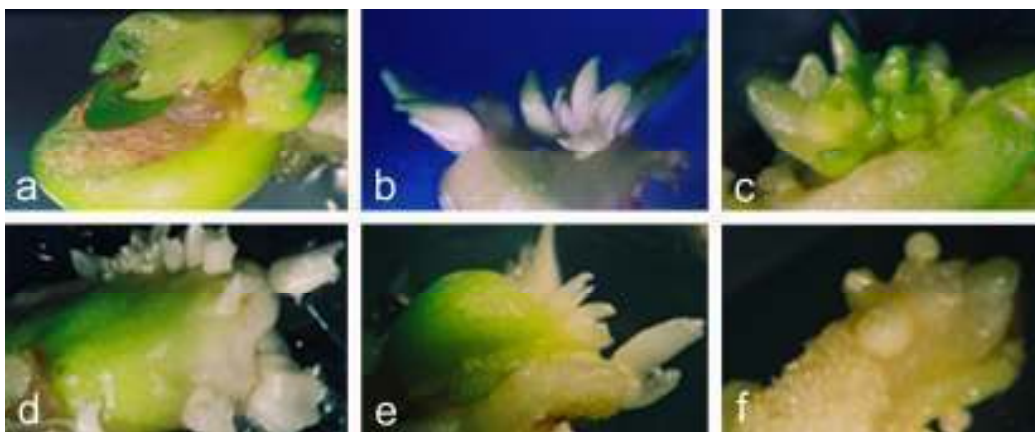
Aktivnost katalaza je relativno konstantna u martu i iznosi od 60,15 u odnosu na novembar mesec kada je bila 89,52 μmolmin^{-1} . Tokom aprila meseca aktivnost katalaza u lukovicama se povećava 14 puta i iznosi $841,805 \pm 23,390 \mu\text{molmin}^{-1}$ (Slika 18 b).

Aktivnost glutacion reduktaze pokazuje manje oscilacije u odnosu na druge enzime koji su mereni kod lukovica gajenih u prirodnim uslovima kao i kod lukovica gajenih *in vitro* (Slika 18 c).

Lukovice gajene u prirodnim uslovima pokazivale su najveću aktivnost peroksidaza ($632,12 \pm 22,54 \mu\text{molmin}^{-1}$) tokom prvog meseca gajenja *ex vitro*. Aktivnost peroksidaza opada i dostiže najmanju vrednost ($109,301 \pm 9,081 \mu\text{molmin}^{-1}$) posle 5 meseci gajenja lukovica *ex vitro* da bi krajem aprila porasla i iznosila $325,72 \pm 29,23 \mu\text{molmin}^{-1}$ (Slika 18 d).

4.3. Indukcija morfogeneze u kulturi segmenata lukovica formiranih *in vitro*

Ispitivan je uticaj dva regulatora rasteanja: 2,4-D (0,1 do 10 mg/l) i TDZ (0,05 do 2 mg/l) na indukciju morfogeneze u kulturi segmenata lukovica formiranih *in vitro* (Slika 19).



Slika 19. Indukcija somatske embriogeneze u kulturi segmenta lukovica *F. meleagris* L. formiranih *in vitro* a), b), c) gajenih na svetlosti i d), e), f) u mraku posle mesec dana na različitim koncentracijama 2,4-D.

Na ispitivanim hranljivim podlogama uspešno je indukovana morfogeneza *in vitro*, i to procesima somatske embriogeneze i organogeneze.

Na hranljivim podlogama koje su sadržale 2,4-D u svim ispitivanim koncentracijama indukovana je somatska embriogeneza i organogeneza na svetlosti i u mraku.

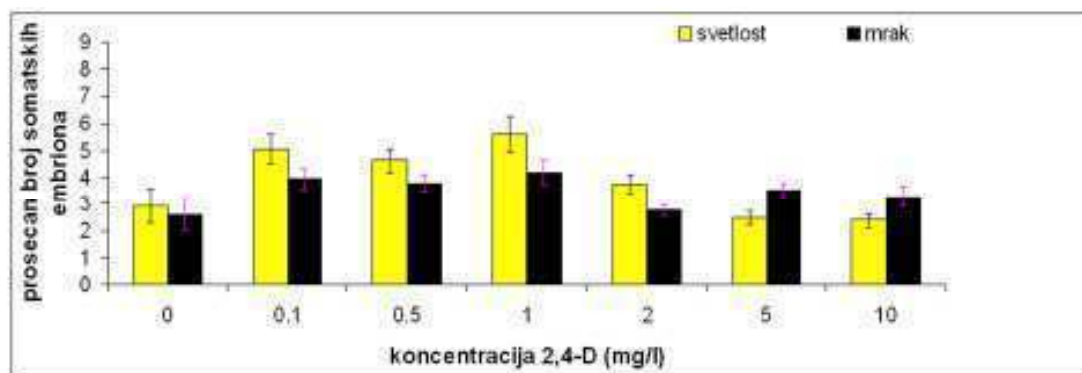
Segmenti lukovice retko kalusiraju, a somatski embrioni se diferenciraju na eksplantatu, već posle deset dana gajenja na svim koncentracijama auksina. Posle mesec dana uočavaju se potpuno formirani somatski embrioni (Slika 19). Somatski embrioni najčešće se diferenciraju na bazalnom delu eksplantata (Slika 19 a) i uglavnom su bele do svetlo zelene boje. Somatski embrioni formirani u mraku (Slika 19 b) su sitniji od somatskih embriona formiranih na svetlosti i obično su bele do svetlo žute boje. Na kraju subkulture somatski embrioni se mogu odvojiti od početnog eksplantata. Visoke koncentracije 2,4-D (preko 1 mg/l) dovode do smanjenja broja somatskih embriona, kalusiranja eksplantata, smanjenja veličine somatskog embriona i zaustavljanja njihovog daljeg rastejanja. Somatska embriogeneza je asinhrona tj. na početnom eksplantatu se mogu uočiti somatski embrioni na različitim stupnjevima razvića.

U kulturama segmenta lukovice koje su gajene na hranljivoj podlozi sa 1 mg/l 2,4-D, na svetlosti formiralo se najviše 5,36 somatskih embriona (Slika 20 a). Neznatno manji broj somatskih embriona (4,21) formirao se na segmentima lukovica gajenim u mraku na istoj hranljivoj podlozi (Slika 20 a). Sa povećanjem koncentracije 2,4-D u hranljivoj podlozi dolazi do smanjenja broja somatskih embriona kod svih kultura, bez obzira na to da li se gaje na svetlosti ili u mraku.

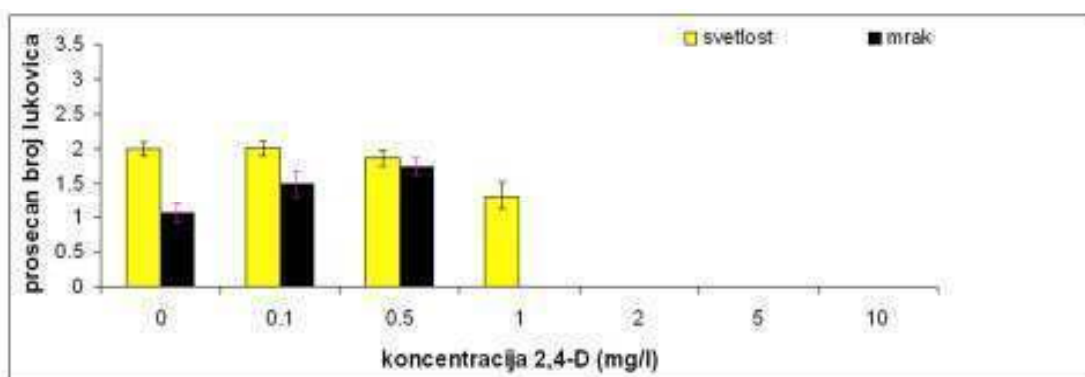
Pored procesa somatske embriogeneze u kulturama segmenta lukovice gajenim na hranljivim podlogama obogaćenim sa 2,4-D indukuje se proces organogeneze tj. dolazi do formiranja lukovica (Slika 20 b).

Organogeneza je indukovana pri koncentraciji 2,4-D od 0-1 mg/l na svetlosti i od 0-0,5 mg/l u mraku. Koncentracije 2,4-D više od 1 mg/l dovode do smanjenja regeneracije lukovica. Najveći broj lukovica (2,0) regenerisan je na hranljivoj podlozi sa 0,1 mg/l 2,4-D (Slika 20 b) gajenih na svetlosti. Na višim koncentracijama 2,4-D dolazi do potpune inhibicije regeneracije lukovica.

a

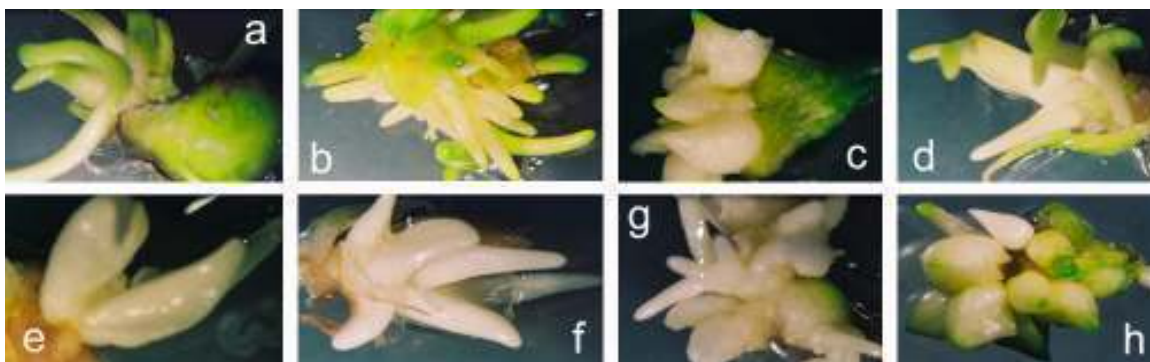


b



Slika 20. Uticaj 2,4-D na indukciju somatske embrigeneze (a) i organogeneze (b) u kulturi segmenata lukovica *F. meleagris* L. formiranih *in vitro*

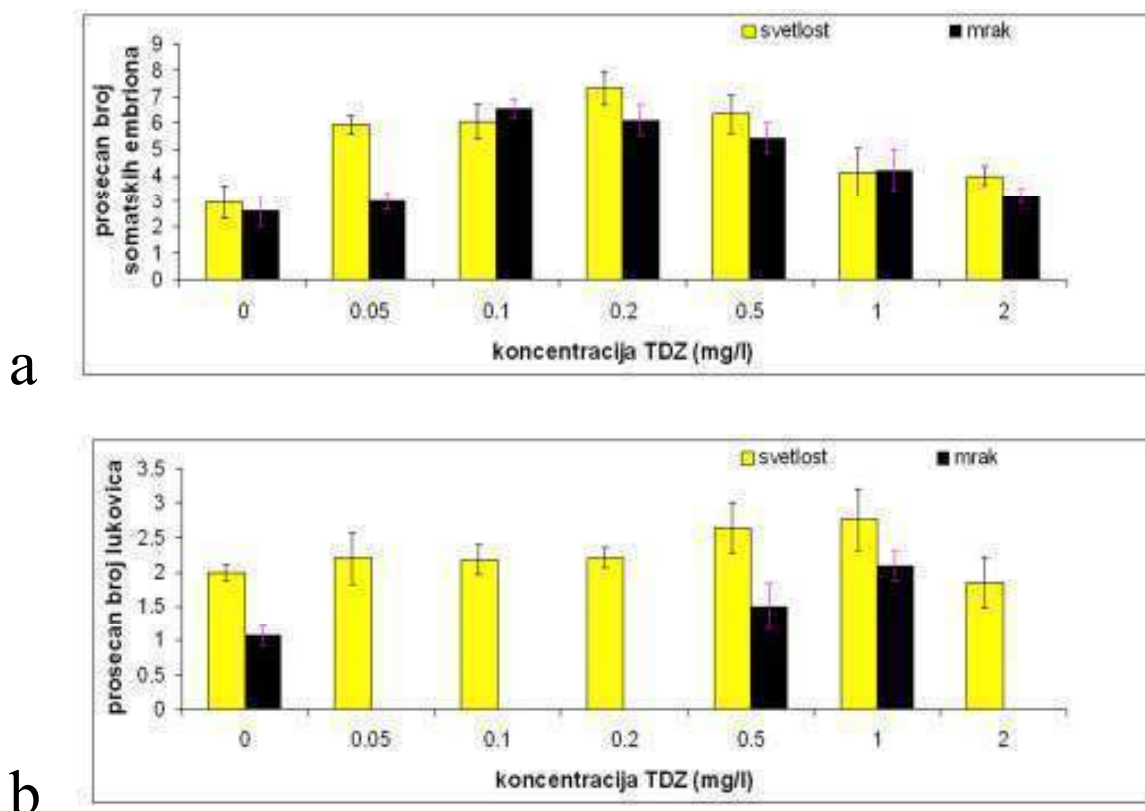
U kulturama segmenata lukovica na hranljivim podlogama koje su sadržale TDZ u svim ispitivanim koncentracijama indukovana je direktna somatska embriogeneza i organogeneza (Slika 21). Somatski embrioni su bele do svetlo zelene boje i veći su od somatskih embriona formiranih na hranljivoj podlozi sa 2,4-D (Slika 21 a-d). Somatski embrioni diferencirani u mraku (Slika 21 e-h) su bele boje i slabije su razvijeni od somatskih embriona regenerisanih na svetlosti. Lukovice se najčešće razvijaju u bazalnom delu početnog eksplantata i obično su bele boje sa svetlo zelenim vrhom (Slika 21 c). Lukovice formirane u mraku počinju da klijavu tek kada se gaje na svetlosti.



Slika 21. Indukcija somatske embriogeneze u kulturi segmenta lukovica *F. meleagris* L. formiranih *in vitro* a), b), c), d) gajenih na svetlosti i e), f), g), h) mraku posle mesec dana na hranljivim podlogama sa različitim koncentracijama TDZ.

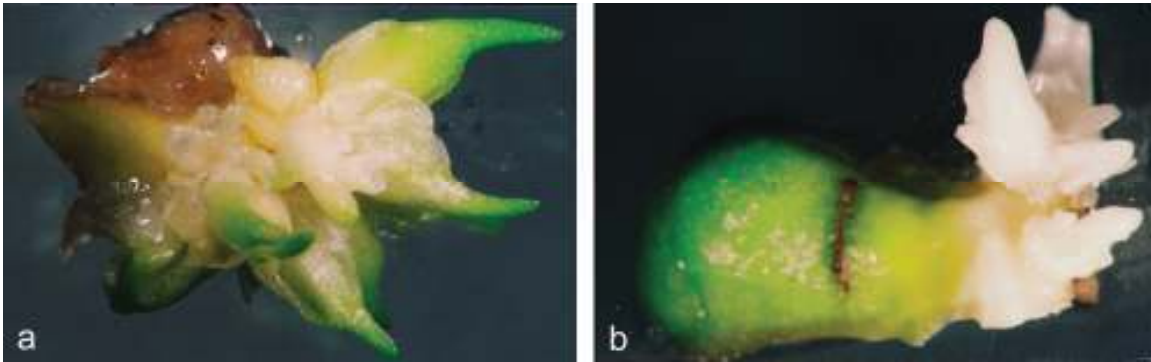
Prosečan broj somatskih embriona raste sa povećanjem koncentracije TDZ u hranljivoj podlozi od 0,05 do 0,2 mg/l (Slika 22 a). Najveći broj somatskih embriona (7,31) formirao se na hranljivoj podlozi sa 0,2 mg/l TDZ na svetlu. Nasuprot tome, u mraku, najveći broj somatskih embriona formirao se na hranljivoj podlozi sa 0,1 i 0,2 mg/l TDZ. Prosečan broj somatskih embriona se postepeno smanjuje sa povećanjem koncentracije TDZ u hranljivoj podlozi (Slika 22 a).

Indukcija organogeneze na hranljivim podlogama obogaćenim sa TDZ postignuta je na svim koncentracijama pri gajenju segmenata lukovica na svetlosti, dok je u uslovima mraka indukcija postignuta jedino na koncentraciji TDZ od 0,5 i 1 mg/l. Najveći broj lukovica (2,76) regenerisan je na hranljivoj podlozi koja je sadržala 1 mg/l TDZ na svetlosti (Slika 22 b).



Slika 22. Uticaj TDZ na indukciju somatske embrigeneze (a) i organogeneze (b) u kulturi segmenata lukovica *F. meleagris* formiranih *in vitro*

Somatska embriogeneza i organogeneza u kulturi segmenata lukovica *F. meleagris* indukovana je i na hranljivoj podlozi bez regulatora rastjenja (Slika 23). Prosečan broj somatskih embriona formiranih na lukovicama gajenim na svetlosti iznosio je 2,95 odnosno 2,62 kod lukovica gajenih u mraku (Slika 20 a i 22 a). Pored toga, na istoj hranljivoj podlozi formirale su se i lukovice kako na svetlosti tako i u mraku (Slika 20 b i 22 b).



Slika 23. Indukcija somatske embriogeneze u kulturi segmenata lukovica *F. meleagris* gajenim na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja. a) na svetlosti b) u mraku

4.4. Indukcija morfogeneze u kulturi baze lista biljaka *F. meleagris* L. gajenih *in vitro*

U kulturi baza listova ispitivan je uticaj 2,4-D i KIN pojedinačno ili u kombinaciji (0,1 do 10 mg/l, svaki) na indukciju morfogeneze *in vitro*. Na svim ispitivanim hranljivim podlogama uspešno je indukovana somatska embriogeneza.

Na bazama listova koje su gajene na hranljivim podlogama sa različitim koncentracijama 2,4-D, već posle deset dana dolazi do pojave morfoloških promena u vidu zelenih, staklastih somatskih embriona na globularnom stadijumu razvića (Slika 24 a). Daljim razvojem, formiraju se somatski embrioni na različitim stadijumima embriogeneze.



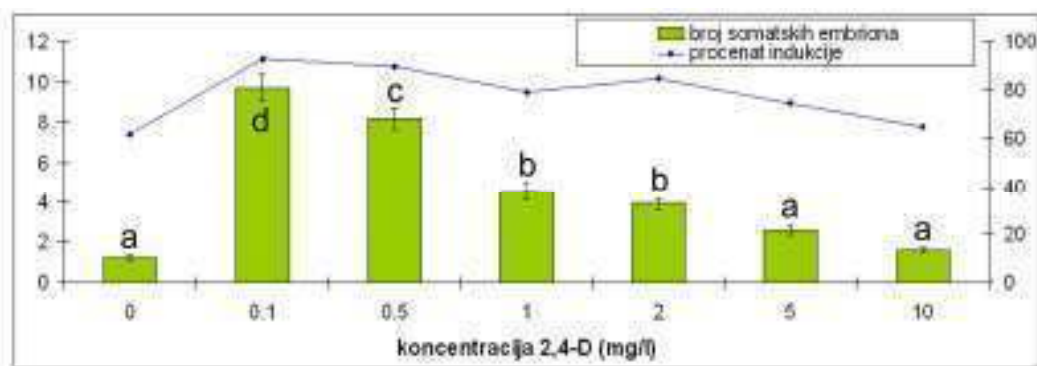
Slika 24. Indukcija somatske embriogeneze u kulturi baze lista *F. meleagris* na hranljivoj podlozi obogaćenoj sa 0,1 mg/l 2,4-D: a) rani globularni embrion formiran na površini lista; b) somatski embrion na srcastom stadijumu razvića; c) somatski embrion na kotiledonarnom stadijumu razvića posle 14 dana od indukcije somatske embriogeneze.

Ovaj proces je asinhron jer se na istom eksplantatu posle dve nedelje u kulturi uočavaju somatski embrioni na srcastom (Slika 24 b) i kotiledonarnom stadijumu (Slika 24 c). Somatski embrioni na srcastom stadijumu razvića su svetlo zelene boje, dok su embrioni na kotiledonarnom stadijumu svetlo žuti sa zelenim vrhovima.

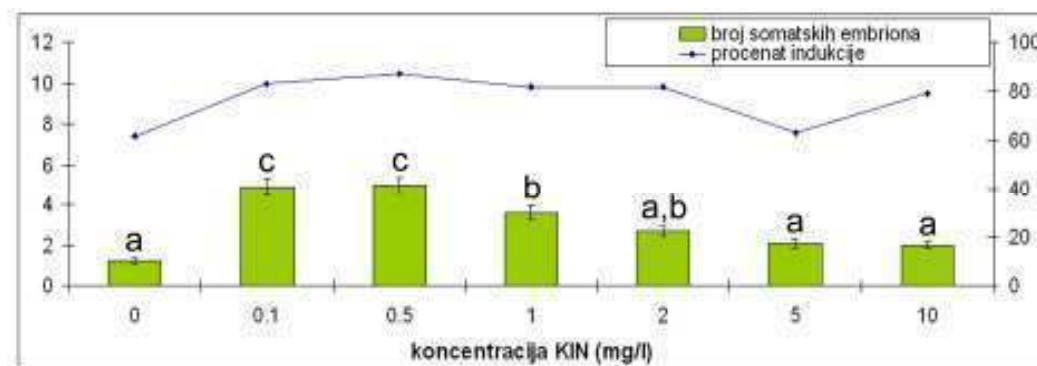
Najveći procenat indukcije (93 %) kao i statistički značajno, najveći broj somatskih embriona po eksplantatu (9,74) dobijen je na MS hranljivoj podlozi sa najnižom koncentracijom 2,4-D (0,1 mg/l). Sa povećanjem koncentracije 2,4-D od 0,5 do 2 mg/l dolazi do smanjenja broja somatskih embriona po eksplantatu. U prisustvu najviših koncentracija 2,4-D (5 i 10 mg/l), prosečan broj somatskih embriona nije statistički značajano veći od broja onih koji se formiraju na hranljivoj podlozi bez regulatora rasteња. (Slika 25 a).

U prisustvu kinetina u opsegu koncentracija od 0,1 do 2,0 mg/l procenat indukcije somatske embriogeneze je približno isti i kreće se od 82 do 87 %. U prisustvu najnižih koncentracija kinetina, 0,1 i 0,5 mg/l, formira se najveći broj somatskih embriona (4,75 odnosno 4,91 somatskih embriona po eksplantatu). Sa povećanjem koncentracije kinetina u hranljivoj podlozi smanjuje se broj formiranih somatskih embriona (Slika 25 b).

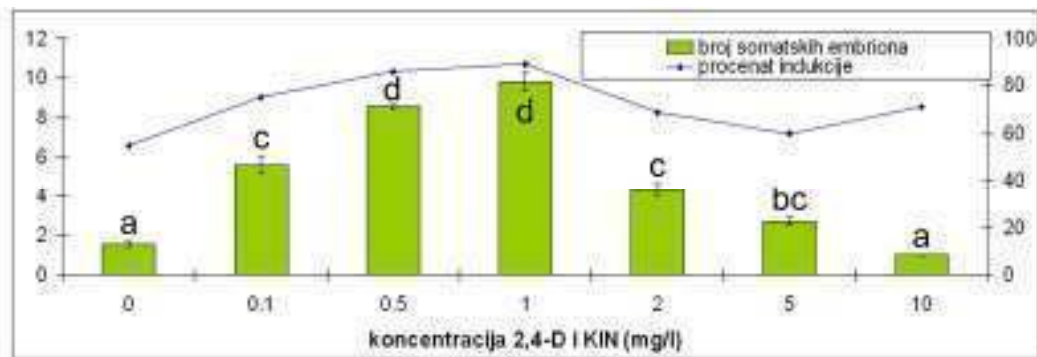
a



b



c



Slika 25 . Indukcija somatske embriogeneze u kulturi baze lista biljaka gajenih *in vitro* na hranljivoj podlozi sa a) 2,4-D b) KIN c) 2,4-D i KIN

Indukcija somatske embriogeneze postignuta je i na svim hranljivim podlogama sa 2,4-D i KIN (Slika 25 c). Najveći procenat indukcije somatske embriogeneze (89 %) kao i najveći broj somatskih embriona po eksplantatu (9,81) zabeležen je na hranljivoj podlozi sa 1 mg/l 2,4-D i 1 mg/l KIN. Sve kombinacije 2,4-D i KIN (0,1, 0,5, 1, 2, i 5 mg/l) osim one

u kojoj su kombinovane najviše koncentracije ova dva regulatora rastenja stimulišu somatsku embriogenezu (Slika 25 c).

Prve morfološke promene vidljive su već posle 7 dana od početka indukcije somatske embriogeneze na svim ispitivanim hranljivim podlogama. Globularni somatski embrioni formiraju se na površini baze lista direktno, tj. bez kalusne interfaze (Slika 26 a). Njihov broj varira u zavisnosti od koncentracije regulatora rastenja i raste sa povećanjem koncentracije 2,4-D i KIN do 1 mg/l. Globularni somatski embrioni su beli do providni i tokom razvoja menjaju boju od žute do svetlo zelene (Slika 26 b-d). Formiranje somatskih embriona je asinhrono tako da se u jednom trenutku na eksplantatu mogu naći embrioni u različitim stadijumima razvića kao što je srcasti (Slika 26 b) i kotiledonarni (Slika 26 c).

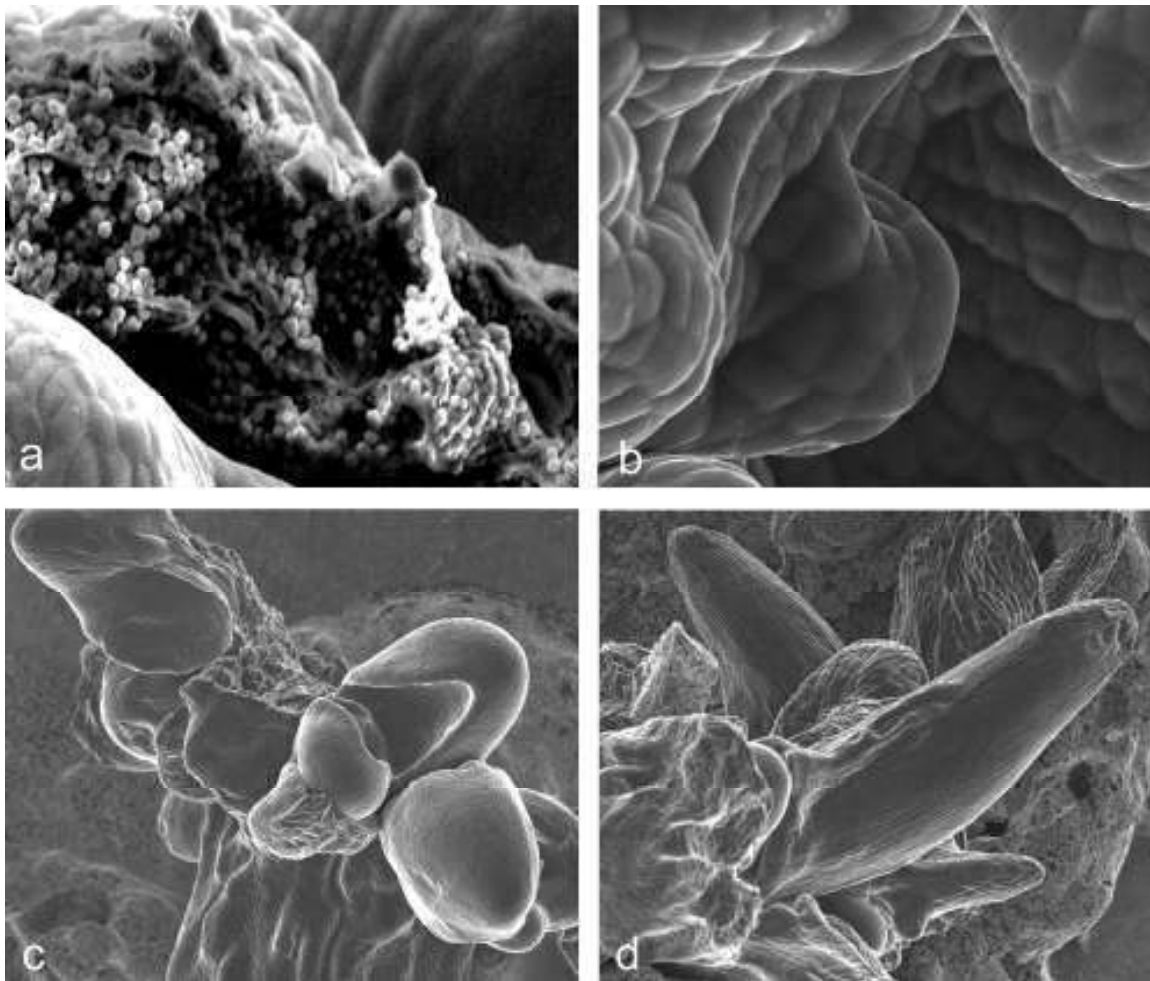


Slika 26. Indukcija somatske embriogeneze u kulturi baze lista *F. meleagris* na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN (1 mg/l, svaki). a) embrion na ranom globularnom stadijumu na površini eksplantata b) somatski embrion na srcastom stadijumu c) somatski embrion na kotiledonarnom stadijumu d) baza lista sa somatskim embrionima na različitim stadijumima razvića.

4.4.1. Anatomska istraživanja somatske embriogeneze u kulturi baze lista

U cilju određivanja porekla somatskih embriona i rasvetljavanja procesa somatske embriogeneze na bazi lista biljaka gajenih *in vitro* urađena su anatomska istraživanja primenom tehnika „scanning“ elektronske i svetlosne mikroskopije.

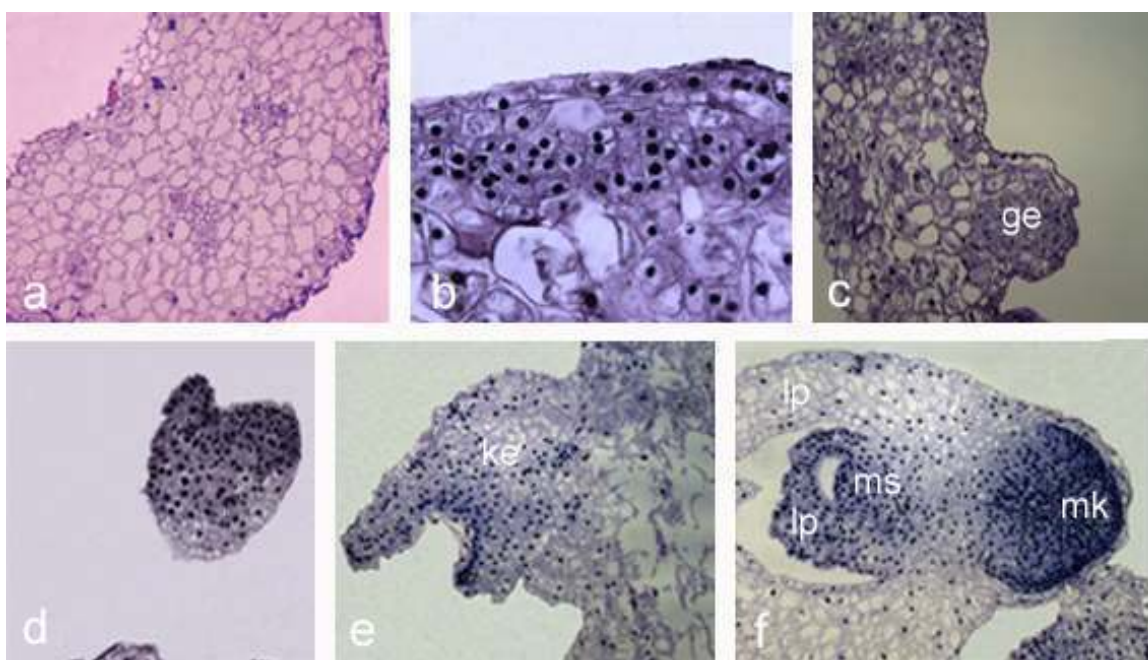
Prve vidljive promene uočavaju se posle 7 dana od početka indukcije somatske embriogeneze u vidu dobro razvijenih embriogenih nodula na površini lista (Slika 27 a). Globularni somatski embrioni formiraju se posle 10 do 14 dana (Slika 27 b). Posle mesec dana u kulturi mogu se videti potpuno razvijeni somatski embrioni na kotiledonarnom stadijumu razvića (Slika 27 c). Somatska embriogeneza *F. meleagris* je asinhrona, što je potvrđeno pojavom velikog broja somatskih embriona na različitim stadijumima razvića (Slika 27 d).



Slika 27. “Scanning“ elektronske mikrografije somatske embriogeneze u kulturi baze lista *F. meleagris* na hranljivoj podlozi sa 2,4-D. a) proembriogene nodule na površini lista b) globularni somatski embrion c) rani kotiledonarni stadijum razvića somatskog embriona; d) potpuno razvijen somatski embrion na kotiledonarnom stadijumu razvića.

Histološke promene u bazi lista na uzdužnom preseku početnog eksplantata, koji je gajen 8 dana na MS hranljivoj podlozi obogaćenoj sa 0,1 mg/l 2,4-D uočavaju se u epidermalnim ćelijama u vidu promene njihove veličine i oblika (Slika 28 a). Paralelno sa ovim procesom dolazi i do intenzivnih ćelijskih deoba u subepidermalnom delu lista koje dovode do formiranja proembriogenih meristemskih centara. Ovi meristemski centri su izgrađeni od sitnih ćelija sa izraženim jedrom i gustom citoplazmom. Daljim antiklinim

ćelijskim deobama dolazi do formiranja i prvih globularnih somatskih embriona. Oni su izgrađeni od izodijametričnih ćelija okruženih slojem protoderma (Slika 28 c). Tokom narednih deset dana u kulturi intenzivnim ćelijskim deobama duž ose globularnog somatskog embriona formira se razvojni stadijum sa izraženom polarnošću-srcasti somatski embrion (Slika 28 d). Posle 4 nedelje gajenja na hranljivoj podlozi sa auksinom na poprečnom preseku početnog eksplantata može se uočiti i somatski embrion na ranom kotiledonarnom stadijumu razvića (Slika 28 e).



Slika 28. Anatomska istraživanja indukcije somatske embriogeneze u kulturi baze lista *F. meleagris*. a) poprečni presek početnog eksplantata; b) proembriogeni meristemski centri c) somatski embrion na globularnom stadijumu razvića (ge) d) somatski embrion na srcautom stadijumu razvića; e) rani kotiledonarni stadijum razvića somatskog embriona (ke) f) potpuno razvijen kotiledonarni stadijum somatskog embriona sa meristemom stabla (ms) i korena (mk) kao i razvijenim lisnim primordijama (lp).

Kako je proces somatske embriogeneze asinhron, na poprečnom preseku baza lista uočavaju se kompletno razvijeni somatski embrioni. Na poprečnom preseku kotiledonarnog somatskog embriona uočavaju se meristem stabla, meristem korena i dobro

razvijene lisne primordije (Slika 28 f). Somatski embrioni vode poreklo od epidermalnih i subepidermalnih ćelija lista i na kraju procesa diferencijacije nemaju vaskularnu vezu sa početnim eksplantatima. Anatomska istraživanja ukazuju na to da je somatska embriogeneza direktna i da somatski embrioni imaju višćelijsko poreklo.

4.5. Biohemijski aspekti indukcije *in vitro* morfogeneze *F. meleagris*

Ispitivana je aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, CAT i POX) i esteraza, kao i koncentracija i profil arabinogalaktanskih proteina tokom indukcije morfogeneze *in vitro* na dve hranljive podloge: 1. 2,4-D i KIN (1 mg/l, svaki) i 2. TDZ (1 mg/l).

4.5.1. Kvantifikacija antioksidativnih enzima tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenata lukovica

Za indukciju morfogeneze *in vitro* korišćene su lukovice koje su prethodno mesec dana gajene na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rasteanja pri: I standardnim uslovima gajenja (24 °C, 3% saharoza); II sniženoj temperaturi (4 °C, 3% saharoza); III povećanoj koncentraciji saharoze (24 °C, 4,5 % saharoza). Za analizu antioksidativnih enzima korišćeni su segmenti lukovica gajeni na MS hranljivim podlogama za indukciju morfogeneze *in vitro* (2,4-D i KIN, TDZ). Praćena je dinamika promene aktivnosti antioksidativnih enzima tokom prve 4 nedelje (svakih 7 dana) indukcije morfogeneze *in vitro*.

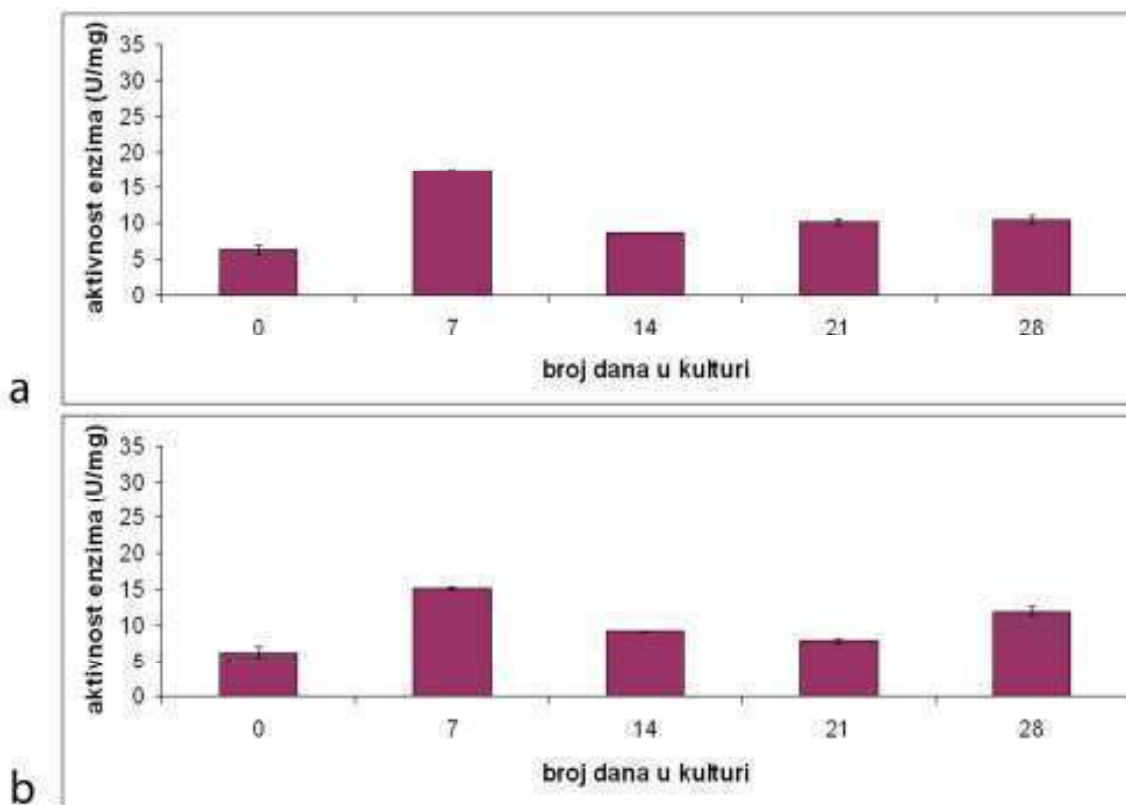
4.5.1.1. Kvantifikacija superoksid dismutaze

Aktivnost SOD u kulturi segmenata lukovica koje su predhodno gajene mesec dana na 24 °C prikazana je na Slici 29.

Posle 7 dana od početka indukcije morfogeneze *in vitro* na obe hranljive podloge zabeležena je najveća aktivnost SOD ($17,39 \pm 0,16 \mu\text{molmin}^{-1}$) i to na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN (Slika 29 a), a na hranljivoj podlozi sa TDZ $15,12 \pm 0,26 \mu\text{molmin}^{-1}$ (Slika 29

b). Najniža aktivnost je zabeležena kod segmenata lukovica odmah posle izolacije ($6,33 \pm 0,69 \mu\text{molmin}^{-1}$).

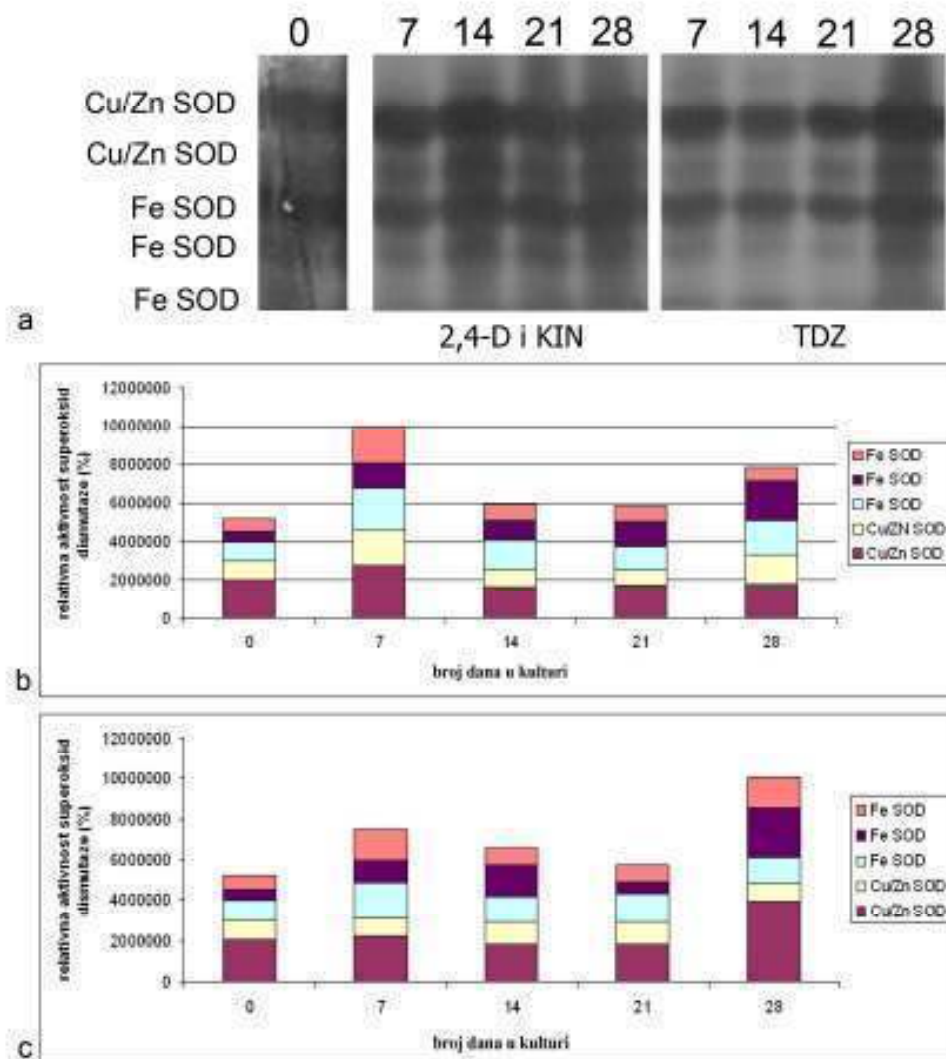
Posle 14 dana od početka indukcije, na obe ispitivane hranljive podloge, dolazi do pada aktivnosti superoksid dismutaze. Na kraju subkulture na hranljivoj podlozi sa TDZ uočeno je neznatno povećanje aktivnosti SOD u segmentima lukovice.



Slika 29. Aktivnost superoksid dismutaze tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenata lukovica *F. meleagris* posle gajenja lukovica na 24 °C na hranljivim podlogama obogaćenim sa: a) 2,4-D i KIN; b) TDZ.

Nativnom elektroforezom je utvrđeno prisustvo 5 izoformi SOD od čega su dve Cu/Zn SOD i tri Fe SOD (Slika 30 a). Svih pet izoformi je aktivno tokom indukcije morfogeneze *in vitro* na oba induktivna tretmana. Najveća relativna aktivnost SOD zabeležena je 7 dana od početka indukcije morfogeneze na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN (Slika 30 b)

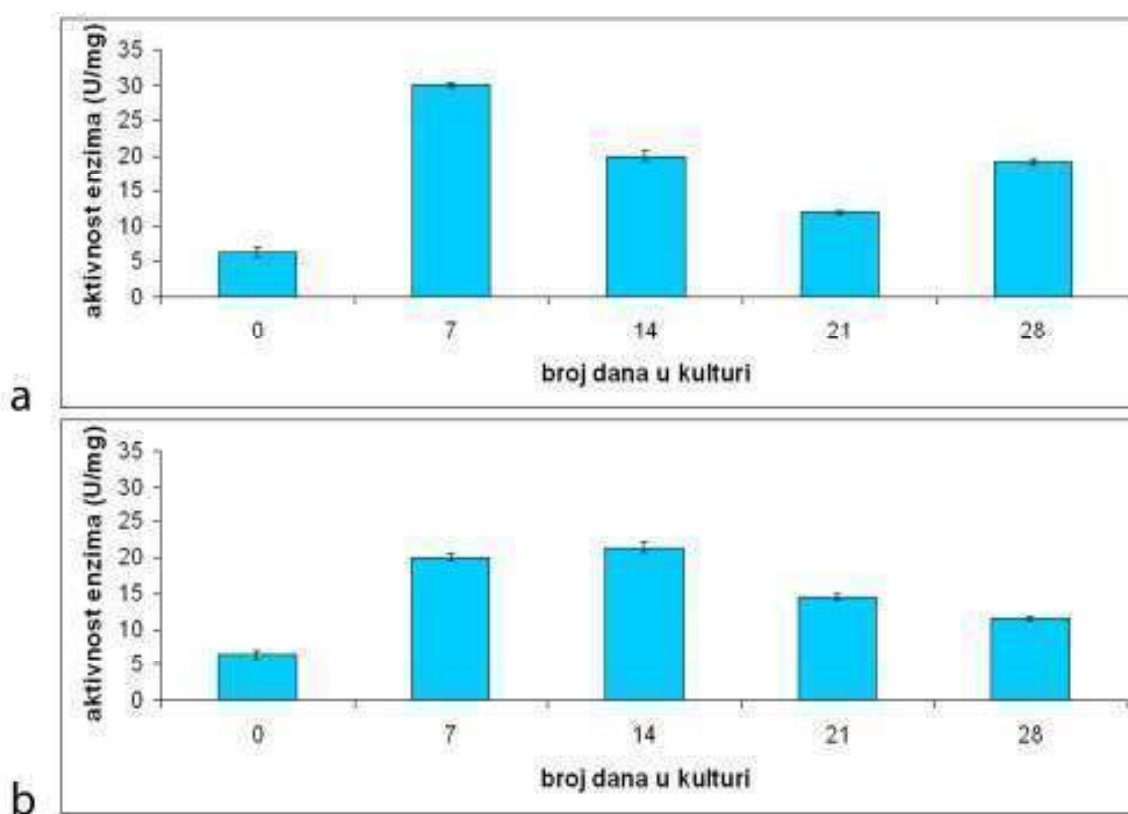
odnosno 28. dana na hranljivoj podlozi sa TDZ (Slika 30 c), dok je najmanja relativna aktivnost zabeležena kod lukovica odmah posle izolacije.



Slika 30. Nativna elektroforeza. a) prikaz izoformi SOD na gelu iz segmenata lukovice *F. meleagris* prethodno gajenih na 24 °C b) relativna aktivnost SOD izoformi u segmentima lukovice *F. meleagris* gajenim na 2,4-D i KIN c) relativna aktivnost SOD izoformi u segmentima lukovice gajenim na TDZ.

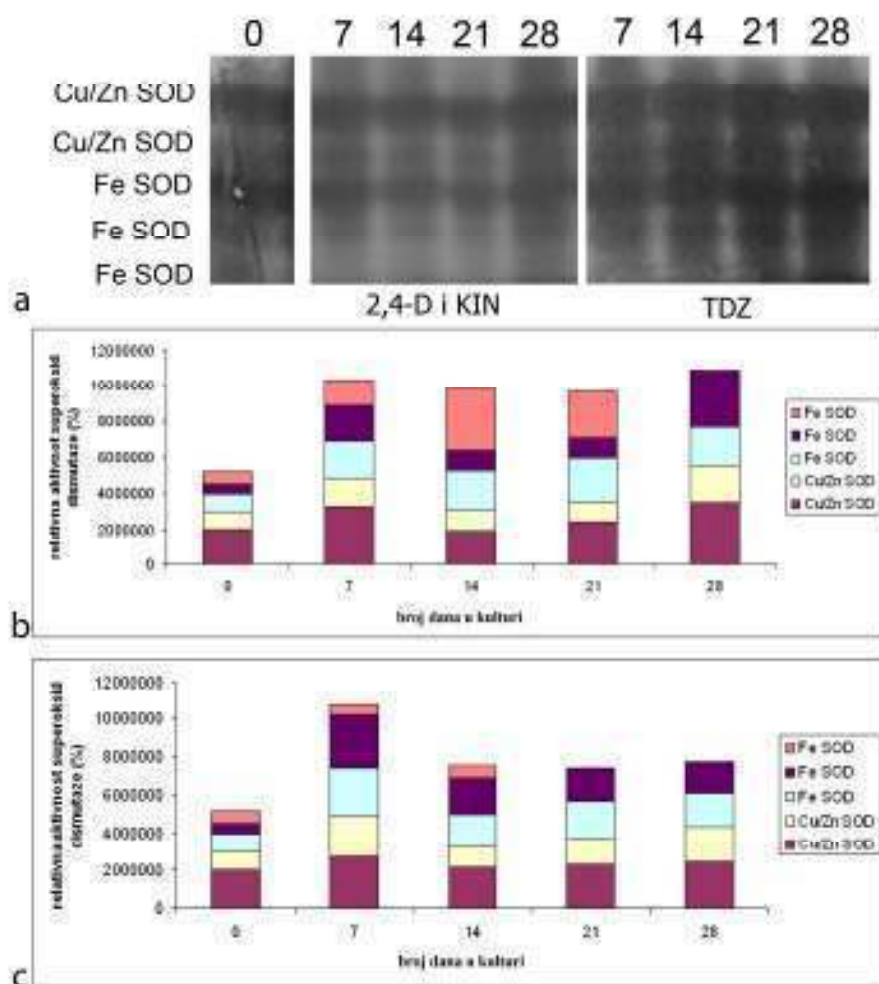
Kod lukovica prethodno gajenih na 4 °C pre izolacije segmenata aktivnost SOD je bila veća u odnosu na segmente lukovica koji su prethodno gajeni na standardnim uslovima (24 °).

Najveću aktivnost SOD ($30,16 \pm 0,33 \mu\text{molmin}^{-1}$) zabeležena je u segmentima lukovica 7 dana posle početka indukcije na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN. Aktivnost SOD opada u segmentima lukovica posle 7 dana u kulturi da bi 28. dana ponovo porasla (Slika 31 a). U segmentima lukovica gajenim na hranljivoj podlozi sa TDZ povišena aktivnost SOD ($21,43 \pm 0,80 \mu\text{molmin}^{-1}$) se zadržava do 14. dana od početka indukcije, a zatim opada (Slika 31 b).



Slika 31. Aktivnost superoksid dismutaze tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenata lukovica *F. meleagris* posle gajenja lukovica na 4 °C na hranljivim podlogama obogaćenim sa: a) 2,4-D i KIN b) TDZ.

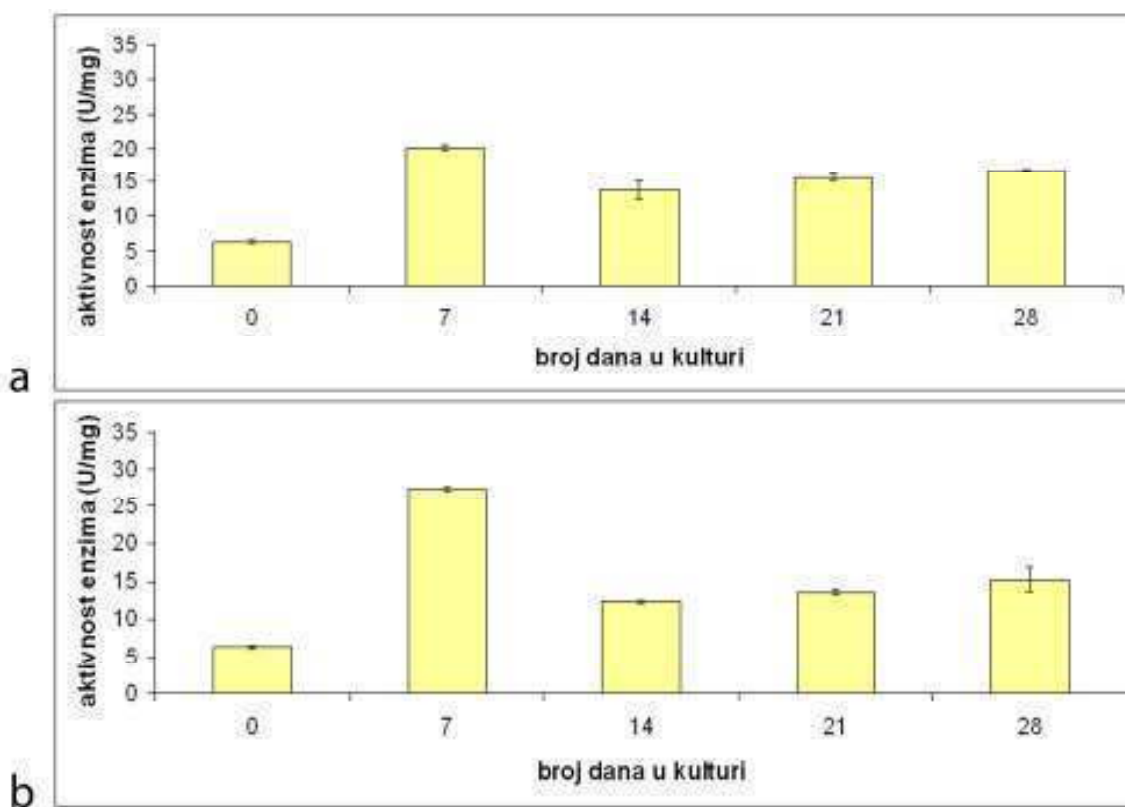
Kada su kao početni eksplantat korišćene lukovice koje su prethodno mesec dana gajene na 4 °C, nativnom elektroforezom je utvrđeno prisustvo svih izoformi SOD, ali one nisu uvek bile aktivne (Slika 32 a). Svih 5 izoformi je aktivno tokom prve tri nedelje indukcije morfogeneze *in vitro* na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN (Slika 32 b), i tokom prve dve nedelje indukcije na hranljivoj podlozi sa TDZ (Slika 32 c).



Slika 32. Nativna elektroforeza. a) prikaz izoformi SOD na gelu iz segmenata lukovice *F. meleagris* prethodno gajenih na 4 °C b) relativna aktivnost SOD izoformi u segmentima lukovice *F. meleagris* gajenim na 2,4-D i KIN c) relativna aktivnost SOD izoformi u segmentima lukovice gajenim na TDZ.

Kasnije ostaju aktivne dve izoforme Cu/Zn SOD i dve Fe SOD. Relativna aktivnost SOD pri indukciji morfogeneze sa 2,4-D i KIN se povećava već 7. dana od početka indukcije i zadržava na nivou višem od početnog sve do 28. dana. Kada je indukcija postignuta na podlozi sa TDZ, relativna aktivnost SOD je najviša 7. dana, a zatim opada do kraja subkulture.

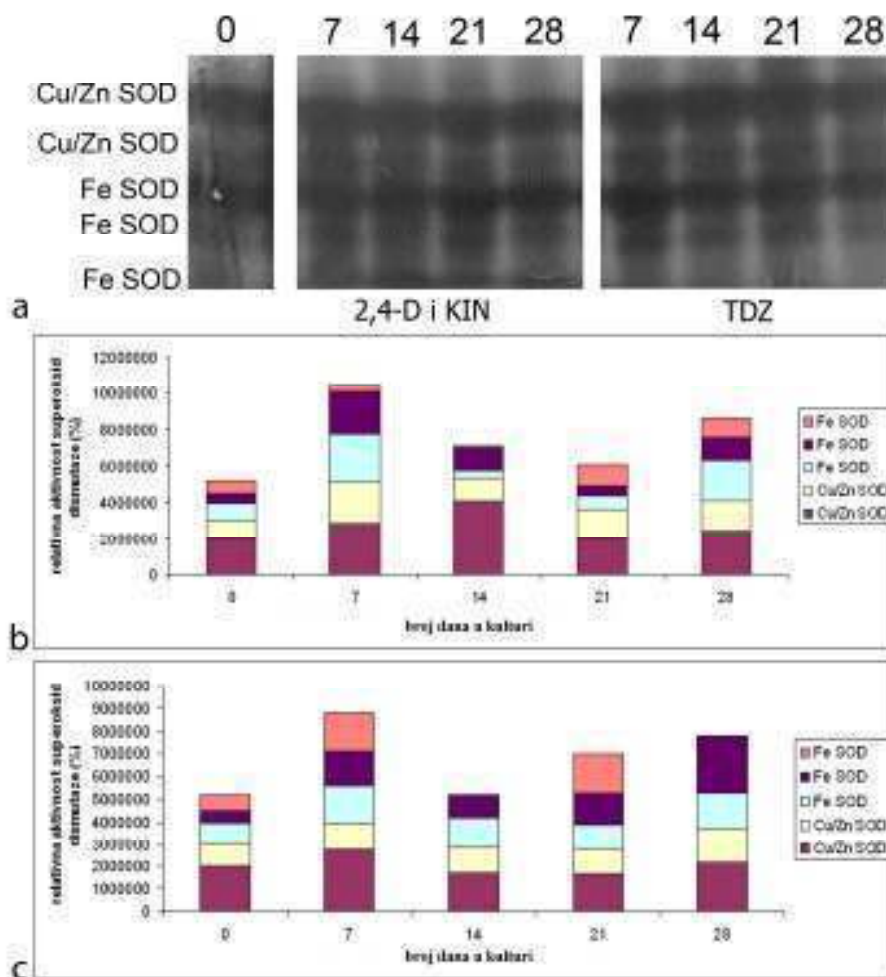
Gajenje lukovica na hranljivoj podlozi sa povećanom koncentracijom saharoze (4,5%) dovodi do povećane aktivnosti SOD u odnosu na lukovice koje su gajene na standardnim uslovima (24 °C i 3% saharoze, Slika 33).



Slika 33. Aktivnost superoksid dismutaze tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenata lukovica *F. meleagris* posle gajenja lukovica na hranljivoj podlozi sa 4,5% saharoze i sa: a) 2,4-D i KIN b) TDZ.

Kao i kod lukovica koje su predhodno gajene na 24 °C najveća aktivnost SOD bila je 7. dana gajenja na obe ispitivane hranljive podloge i to $20,16 \pm 0,42 \mu\text{molmin}^{-1}$ u slučaju

hranljive podloge sa 2,4-D i KIN (Slika 33 a) odnosno $27,41 \pm 0,26 \mu\text{molmin}^{-1}$ kada su lukovice gajene na hranljivoj podlozi sa TDZ (Slika 33 b). Takođe, najmanja aktivnost SOD ($6,33 \pm 0,68 \mu\text{molmin}^{-1}$) bila je kod segmenata lukovica odmah posle izolacije na obe ispitivane hranljive podloge. Aktivnost SOD opada posle 7. dana od početka indukcije morfogeneze *in vitro* i taj nivo aktivnosti se zadržava sve do kraja četvrte nedelje gajenja na obe hranljive podloge.

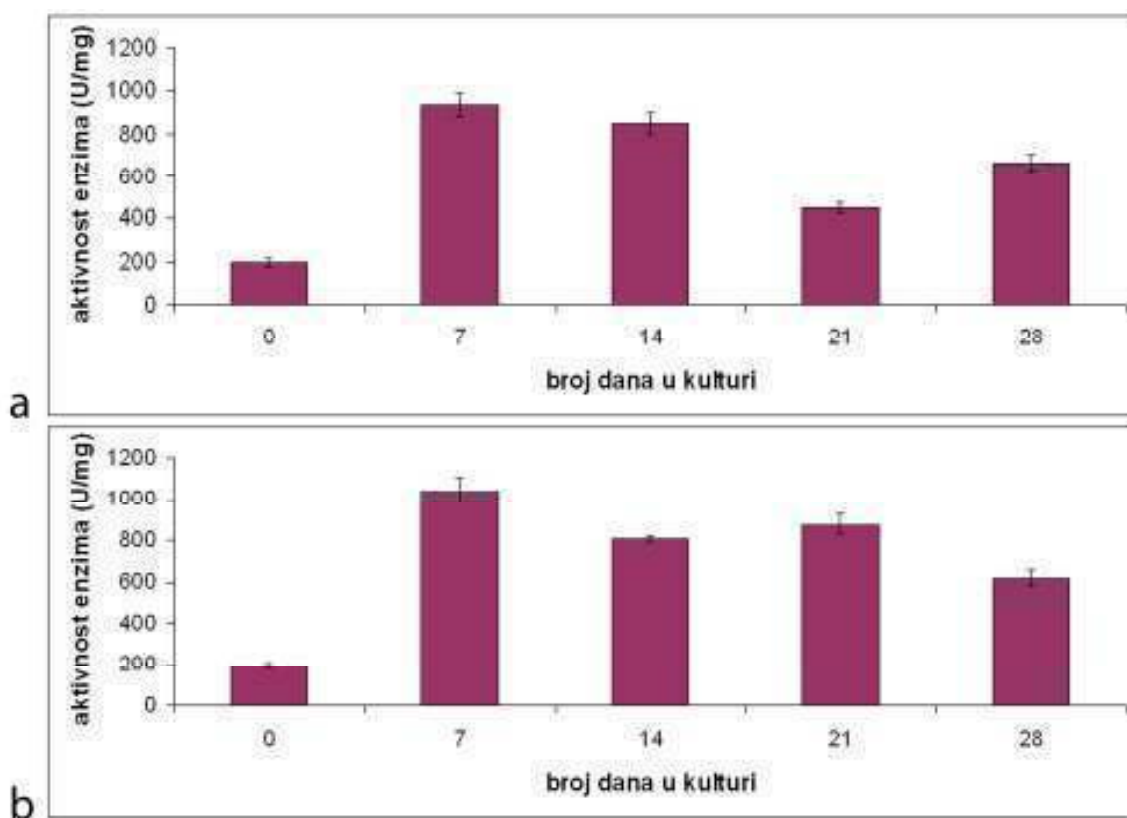


Slika 34. Nativna elektroforeza. a) prikaz izoformi SOD na gelu iz segmenata lukovice *F. meleagris* predhodno gajenih na hranljivoj podlozi sa 4,5% saharoze b) relativna aktivnost SOD izoformi u segmentima lukovice *F. meleagris* gajenim na 2,4-D i KIN c) relativna aktivnost SOD izoformi u segmentima lukovice gajenim na TDZ.

Kada su kao početni eksplantat korišćene lukovice koje su predhodno mesec dana gajene na hranljivoj podlozi sa povišenom koncentracijom saharoze, nativnom elektroforezom je utvrđeno prisustvo svih izoformi SOD, ali sve izoforme nisu uvek bile aktivne (Slika 34 a). U segmentima lukovica gajenim na hranljivoj podlozi sa 2,4-D aktivnost svih 5 izoformi je potvrđena (Slika 34 b), a najveća relativna aktivnost je uočena 7. dana gajenja. Posle 2 i 4 nedelje gajenja na hranljivoj podlozi sa TDZ primećeno je odsustvo jedne Fe SOD izoforme. Najveća relativna aktivnost SOD zabeležena je takođe 7. dana gajenja segmenata lukovica u kulturi (Slika 34 c).

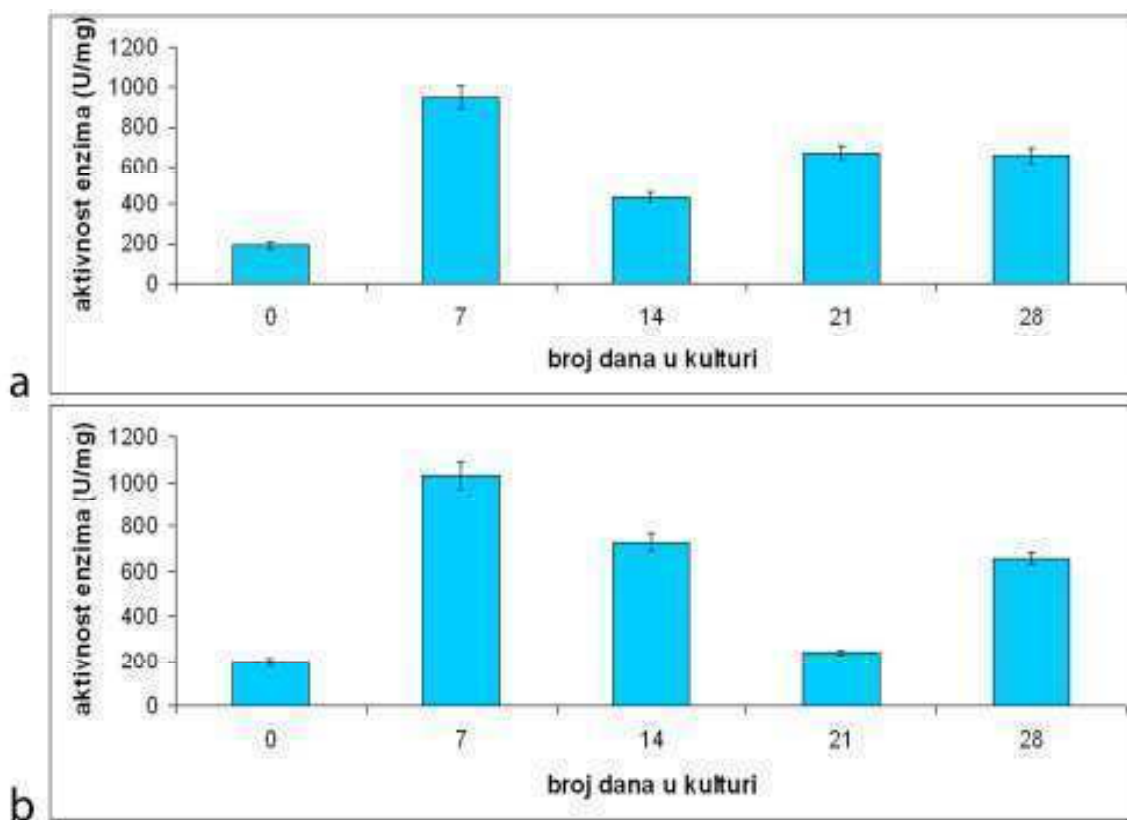
4.5.1.2. Kvantifikacija katalaza

Aktivnost katalaza se naglo povećava već 7. dana od početka gajenja segmenata lukovica predhodno gajenih u standardnim uslovima (24 °C i 3% saharoze) na obe ispitivane hranljive podloge (Slika 35). Najveća aktivnost katalaza iznosila je $1041,85 \pm 58,82 \mu\text{molmin}^{-1}$ i zabeležena je u segmentima lukovica gajenim na hranljivoj podlozi sa TDZ. Aktivnost katalaza je najmanja ($196,08 \pm 18,4 \mu\text{molmin}^{-1}$) na tek izolovanim segmentima. Aktivnost katalaza opada posle 7. dana od početka indukcije na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN, pa sve do 21. dana, a zatim raste (Slika 35 a). Kod segmenata lukovica gajenih na hranljivoj podlozi sa TDZ aktivnost CAT opada do 14. dana, zatim se neznatno povećava 21. dana i dostiže najmanju vrednost 28. dana gajenja na toj hranljivoj podlozi (Slika 35 b).



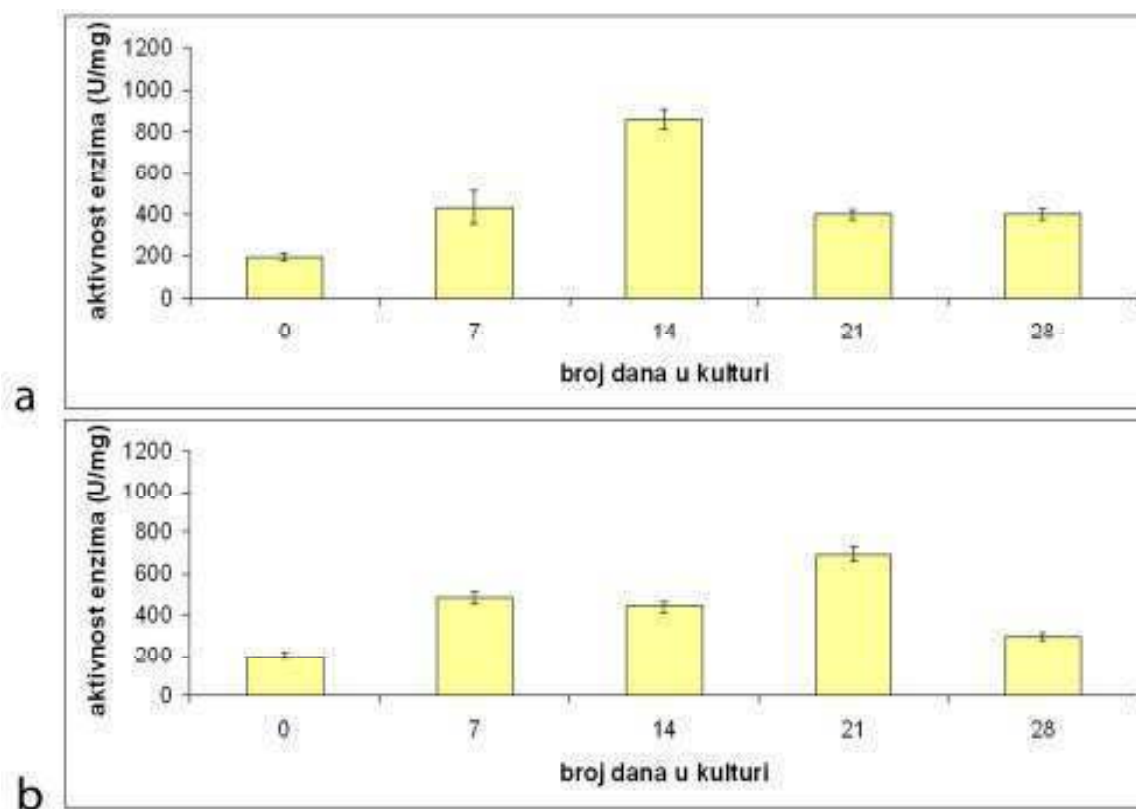
Slika 35. Aktivnost katalaza tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenata lukovica *F. meleagris* posle gajenja lukovica na 24 °C na hranljivim podlogama obogaćenim sa: a) 2,4-D i KIN b) TDZ.

Aktivnost katalaza u segmentima lukovica posle prethodnog gajenja lukovica na 4 °C se naglo povećava 7 dana posle izolacije na obe ispitivane hranljive podloge (Slika 36 a i b). Najmanja aktivnost katalaza ($196,08 \pm 18,4 \mu\text{molmin}^{-1}$) uočena kod segmenata lukovica odmah posle izolacije. Aktivnost katalaza opada odmah 7 dana posle početka indukcije na obe hranljive podloge i dostiže minimum 14. dana gajenja na hranljivoj podlozi sa 2,4-D, odnosno 21. dana na hranljivoj podlozi sa TDZ. Maksimalna aktivnost ukupnih katalaza kod segmenata lukovica gajenih na hranljivoj podlozi sa TDZ detektovana je 7. dana od početka indukcije ($1031,50 \pm 63,39 \mu\text{molmin}^{-1}$) kao i kod lukovica koje su predhodno gajene na 24 °C (Slika 36).



Slika 36. Aktivnost katalaza tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenata lukovica *F. meleagris* posle gajenja lukovica na 4 °C na hranljivim podlogama obogaćenim sa: a) 2,4-D i KIN b) TDZ.

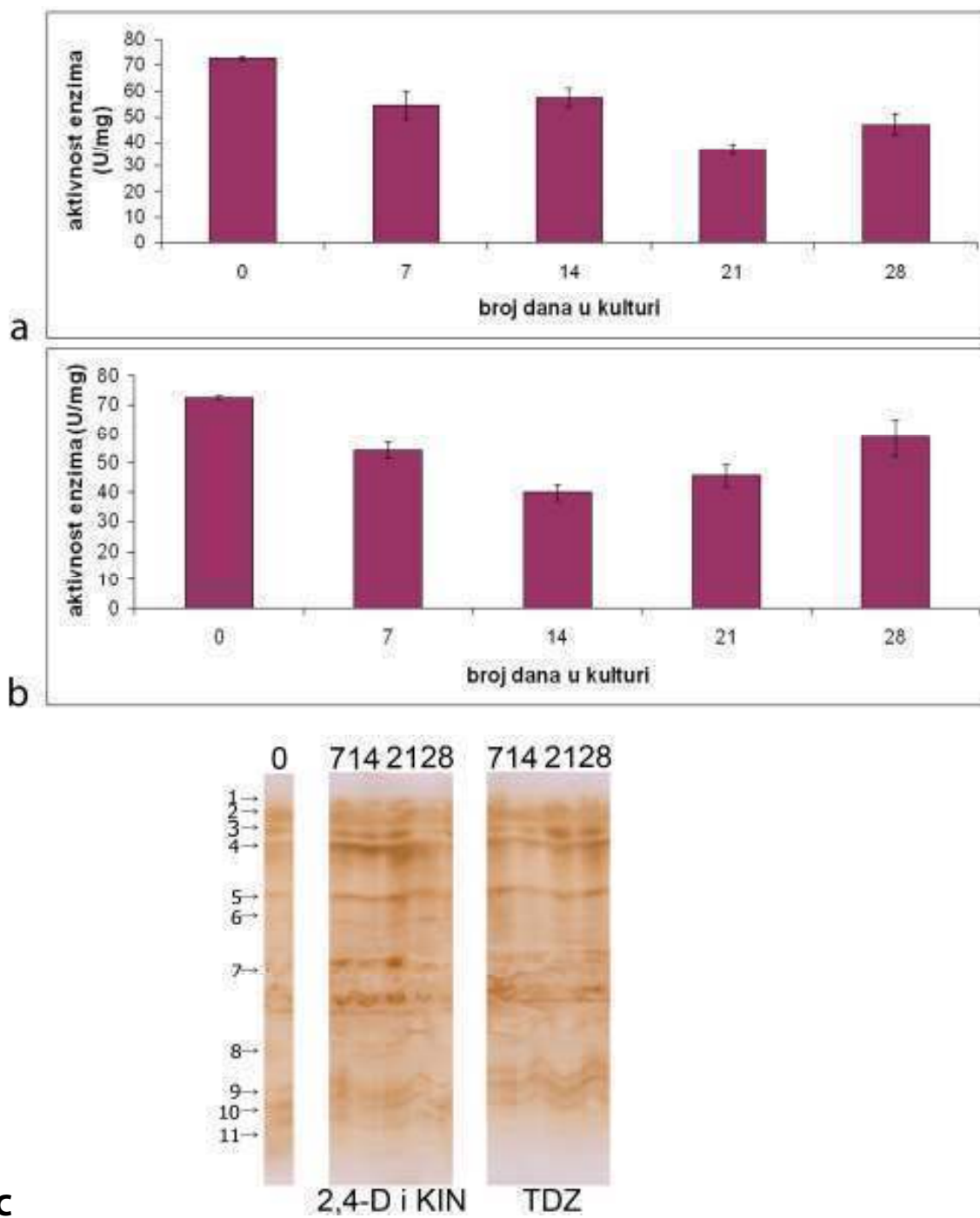
Aktivnost katalaza se povećava u segmentima lukovica i kada su lukovice predhodno gajene na povećanoj koncentraciji saharoze (Slika 37 a i b). Za razliku od predhodnih pretretmana lukovica, u ovom su najviše vrednosti katalaza detektovane tek 14. dana od indukcije u slučaju hranljive podloge sa 2,4-D i KIN ($861,92 \pm 48,81 \mu\text{molmin}^{-1}$), odnosno 21. dana u slučaju hranljive podloge sa TDZ ($691,99 \pm 38,21 \mu\text{molmin}^{-1}$).



Slika 37. Aktivnost katalaza tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenata lukovica *F. meleagris* posle gajenja lukovica na hranljivoj podlozi sa 4,5% saharoze i sa: a) 2,4-D i KIN b) TDZ.

4.5.1.3. Kvantifikacija peroksidaza

Aktivnost ukupnih peroksidaza bila je najveća ($72,72 \pm 0,68 \mu\text{molmin}^{-1}$) kod segmenata lukovica neposredno posle izolacije. U segmentima lukovice gajenim na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN tri nedelje zabeležena je najmanja aktivnost ($37,03 \pm 2,20 \mu\text{molmin}^{-1}$) peroksidaza, dok je kod segmenata lukovice gajenih na hranljivoj podlozi sa TDZ najmanja vrednost peroksidaza ($39,90 \pm 2,73 \mu\text{molmin}^{-1}$) detektovana je 14. dana od početka gajenja na hranljivoj podlozi (Slika 38 a i b).

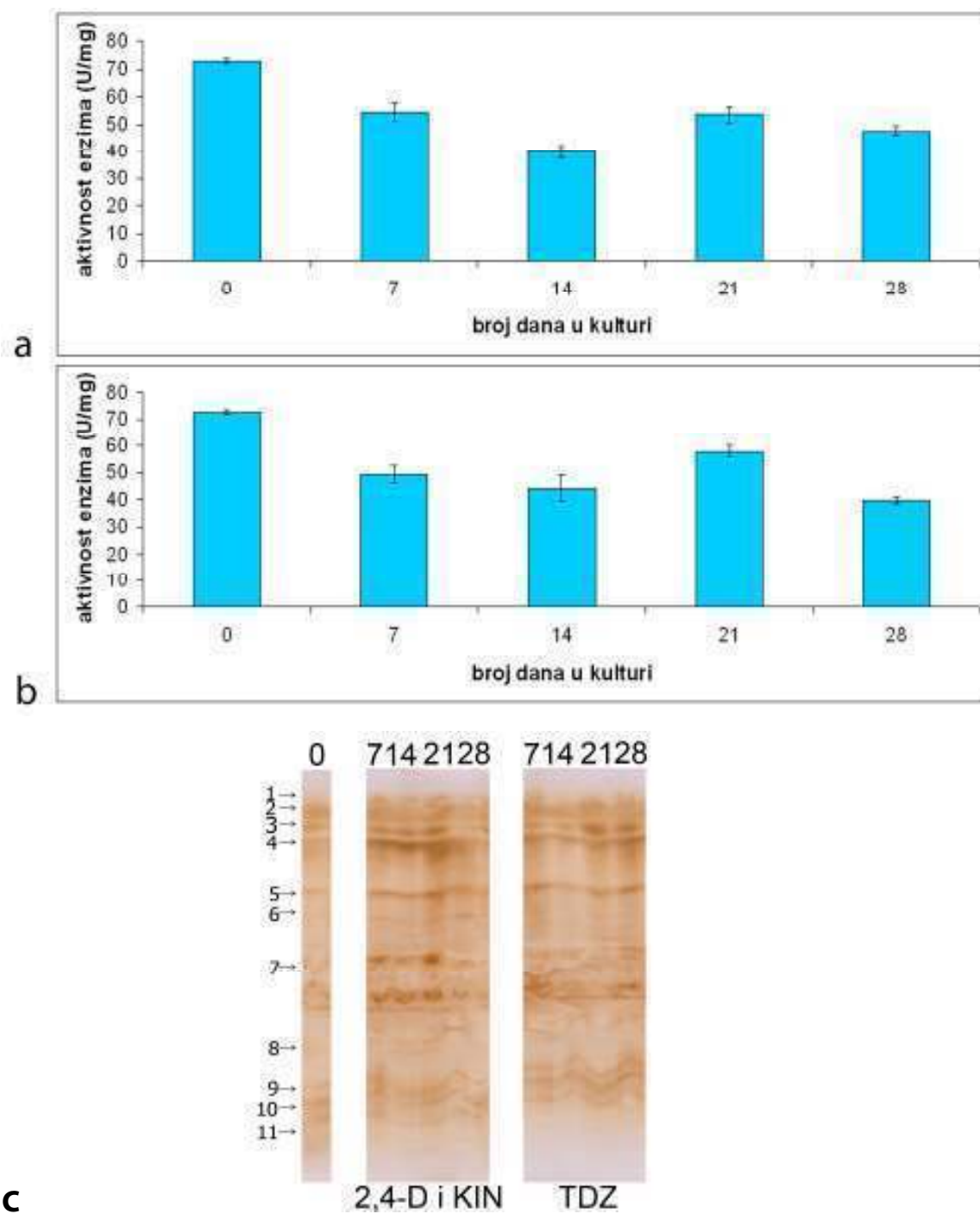


Slika 38. Aktivnost peroksidaza u kulturi segmenata lukovice *F. meleagris* posle gajenja lukovica na 24 °C, na hranljivim podlogama obogaćenim sa: a) 2,4-D i KIN b) TDZ c) Zimografska detekcija peroksidaza .

Tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenata lukovica uočeno je ukupno 11 izoformi peroksidaza koje su obeležene brojevima od 1 i 11 (Slika 38 c). Izoforme 1, 6, 8 nisu detektovane u segmentima lukovica neposredno posle izolacije. Izoforma 2 je jače izražena u tim segmentima lukovica nego u segmentima lukovica gajenim na obe ispitivane hranljive podloge. Izoforme 6 i 7 su veoma slabo izražene kod segmenata lukovica gajenih na hranljivoj podlozi sa TDZ u odnosu na segmente lukovica gajene na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN. Izoforma 6 je najjače izražena kod segmenata lukovice gajenih na 2,4-D i KIN 28 dana posle indukcije.

Kao i kod segmenata lukovica izolovanih iz lukovica gajenih pri standardnim uslovima, aktivnost ukupnih peroksidaza ($72,72 \pm 0,68 \mu\text{molmin}^{-1}$) u segmentima lukovice prethodno gajenih na 4 °C bila je najveća neposredno posle izolacije (Slika 39 a i b).

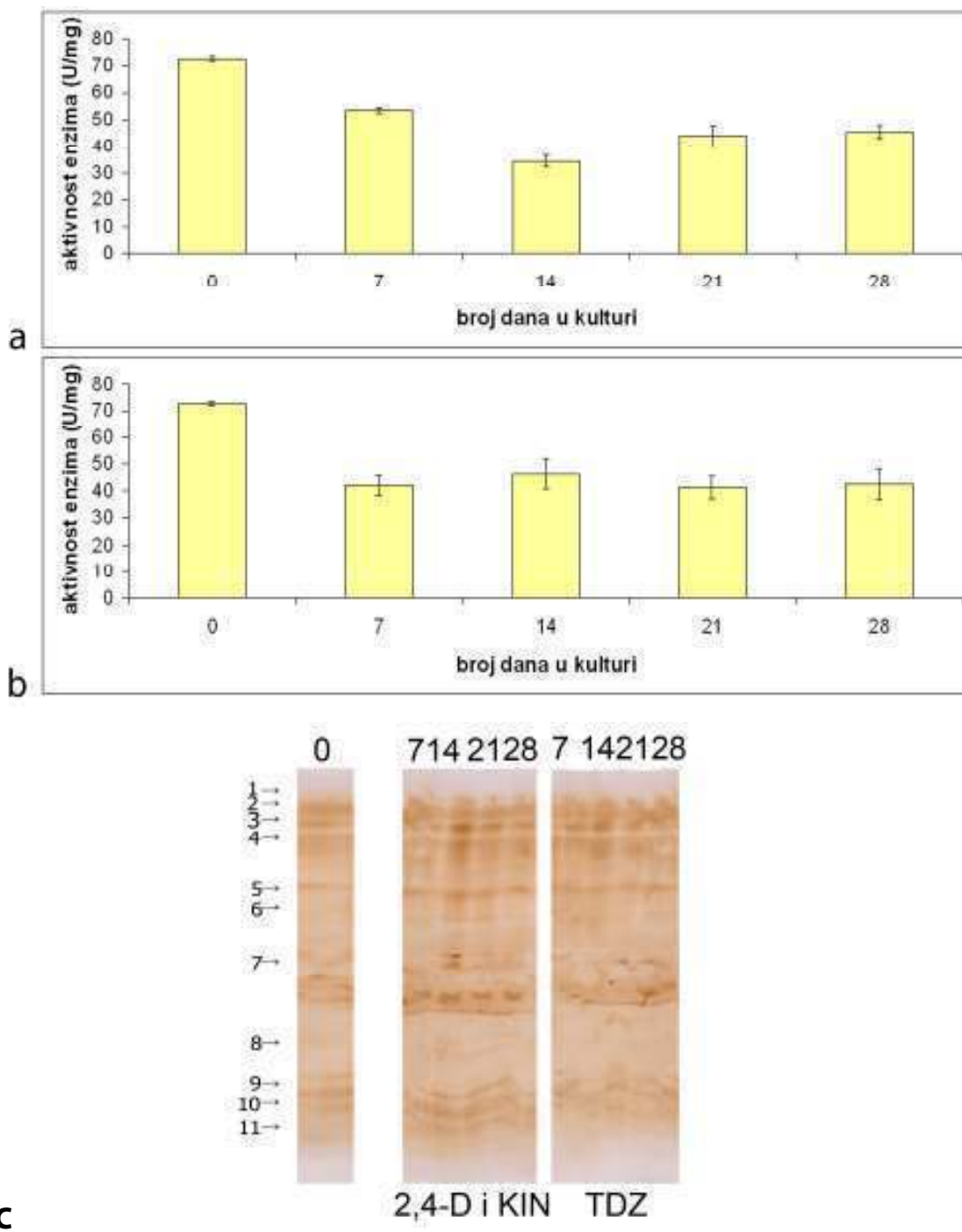
I kod ovih segmenata lukovica, prethodno gajenih na 4 °C, aktivno je ukupno 11 izoformi peroksidaza (Slika 39 c). Izoforme 1, 6, 8 takođe nisu detektovane u segmentima lukovica posle izolacije, dok je izoforma 2 jače izražena. I ovde izoforme 6 i 7 su veoma slabo izražene kod segmenata lukovica gajenih na hranljivoj podlozi sa TDZ. Izoforma 7 je veoma izražena kod segmenata lukovice gajenih na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN posebno tokom prve tri nedelje gajenja.



Slika 39. Aktivnost peroksidaza u kulturi segmenata lukovice *F. meleagris* posle gajenja lukovica na 4 °C na hranljivim podlogama obogaćenim sa: a) 2,4-D i KIN b) TDZ c) Zimografska detekcija peroksidaza.

Aktivnost ukupnih peroksidaza bila je najveća ($72,72 \pm 0,68 \mu\text{molmin}^{-1}$) neposredno posle izolacije segmenata iz lukovica prethodno gajenih na povećanoj koncentraciji saharoze (4,5%). Gajenjem segmenata lukovica na hranljivim podlogama dolazi do smanjenja aktivnosti ukupnih peroksidaza (Slika 40 a i b). Najniža aktivnost ukupnih peroksidaza ($33,25 \pm 2,31 \mu\text{molmin}^{-1}$) kod segmenata lukovica gajenih na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN detektovana je 14. dana gajenja na ovoj podlozi, dok je aktivnost POX kod segmenata lukovica gajenih na hranljivoj podlozi sa TDZ ista tokom čitave subkulture, odnosno snižava se u 1. nedelji i 7. dana dostiže vrednost koja ostaje na istom nivou do kraja subkulture.

Prethodno gajenje lukovica na povećanoj koncentraciji saharoze uticalo je na smanjenje broja izoformi peroksidaza, jer je detektovano 10 izoformi peroksidaza. Trake su slabijeg intenziteta nego kod segmenata lukovica konstantno gajenih na 3% saharoze. Izoforme 1 i 6, takođe nisu detektovane u segmentima lukovica neposredno posle izolacije, dok izoforma 8 uopšte nije detektovana. Izoforme 6 i 7 su veoma slabo izražene kod segmenata lukovica gajenih na obe ispitivane hranljive podloge. Izoforma 7 je izražena samo 14. dana od početka gajenja segmenata lukovice na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN i 21. dana kod segmenata lukovica gajenih na hranljivoj podlozi sa TDZ (Slika 40 c).



Slika 40. Aktivnost peroksidaza u kulturi segmenata lukovice *F. meleagris* posle gajenja lukovica na hranljivim podlogama sa 4,5 % saharoze obogaćenim sa: a) 2,4-D i KIN b) TDZ c) Zimografska detekcija peroksidaza.

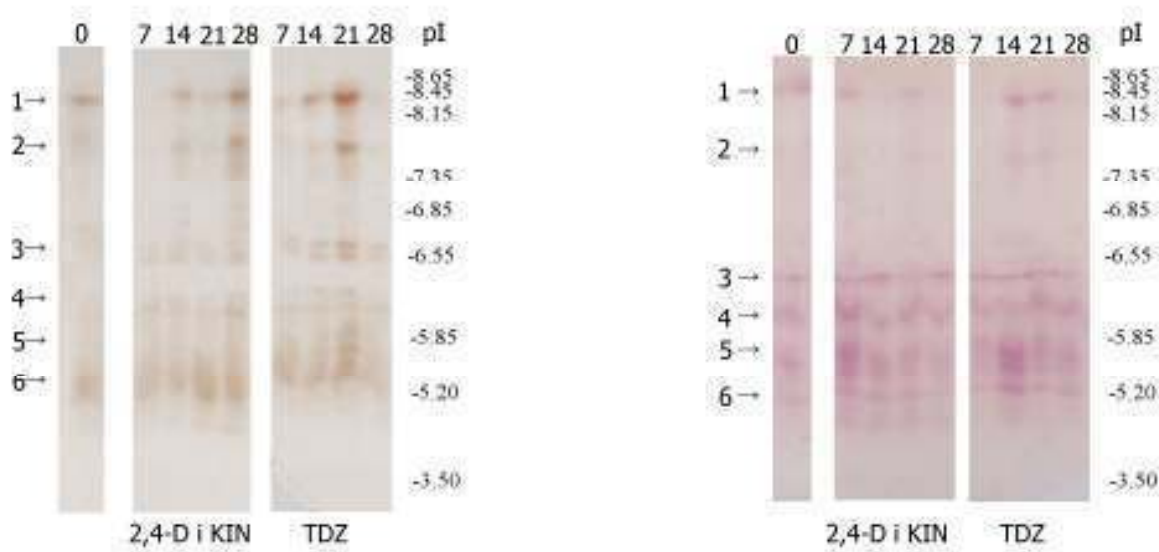
4.5.2. Kvantifikacija esteraza tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenata lukovica

Segmenti lukovica *F. meleagris* su bili izolovani iz lukovica gajenih mesec dana na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja i izloženi različitim pretretmanima: 1. standardnim uslovima gajenja (3% saharoze, 24 °C), 2. sniženoj temperaturi (3% saharoze, 4 °C) kao i 3. povećanoj koncentraciji saharoze (4,5% saharoze, 24 °C). Pretretmani su primenjivani tokom mesec dana, a zatim su izolovani segmenti gajeni na dve hranljive podloge sa regulatorima rastenja (2,4-D i KIN ili TDZ). Detektovano je 6 izoformi esteraza u slučaju oba korišćena supstrata (1 i 2-naftil acetat) koje su označene brojevima od 1 do 6.

Esteraze su detektovane i u kiselom i u baznom pH regionu (Slika 41, 42 i 43). Ispitivane pI vrednosti kretale su se u intervalu od 3.5 do 8.65. Veći broj izoformi esteraza (izoforme 3, 4, 5, 6) detektovan je u kiselom delu spektra sa oba korišćena supstrata. Veću aktivnost u kiselom delu spektra esteraze pokazuju kada se kao supstrat koristi 2-naftil acetat (Slika 41 b, 42 b i 43 b), dok veću aktivnost u baznom delu spektra pokazuju esteraze kada se kao supstrat koristi 1-naftil acetat (Slika 41 a, 42 a i 43 a).

Neposredno posle izolacije uočavaju se samo dve izoforme esteraza označene brojevima 1 i 6 koje su detektovane sa 1-naftil acetatom kao supstratom, dok je 5 izoformi detektovano označenih brojevima 1, 3, 4, 5, 6 kada je kao supstrat korišćen 2-naftil acetat. Izoforme esteraza kod ovih eksplantata su slabijeg intenziteta u odnosu na esteraze izolovane iz segmenata lukovica koje su dalje gajene na hranljivim podlogama sa regulatorima rastenja.

Neposredno posle izolacije segmenata lukovica poreklom od lukovica gajenih na 24 °C uočava se povećanje broja aktivnih izoformi esteraza i to na hranljivoj podlozi sa 2,4-D nakon 14 dana gajenja na ovoj podlozi, dok se u segmentima lukovica gajenim na hranljivoj podlozi sa TDZ aktivnost svih izoformi esteraza može uočiti već posle 7 dana gajenja (Slika 41 a).

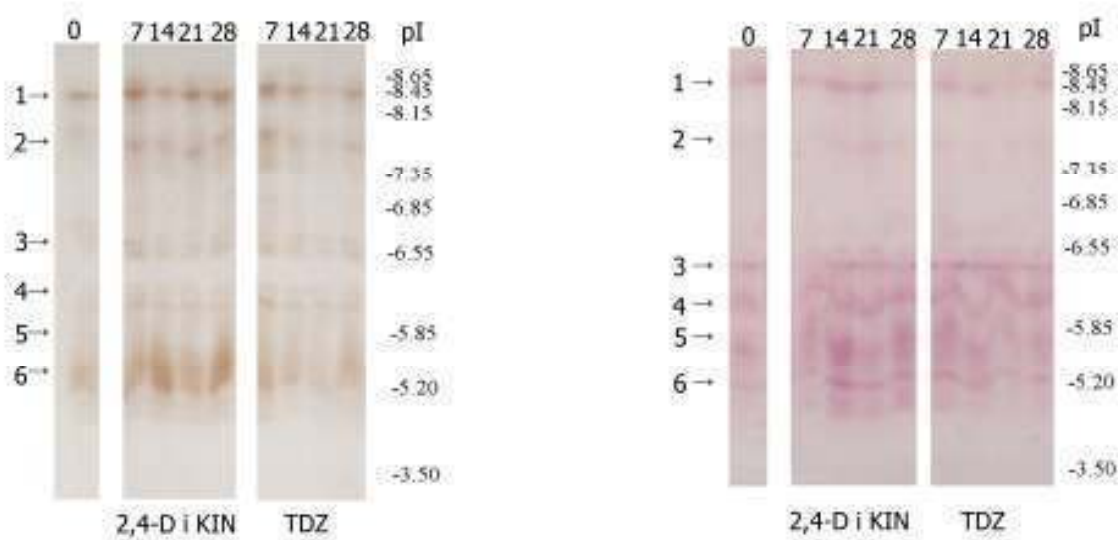


a

b

Slika 41. Zimografska detekcija esteraza detektovanih sa a) 1-naftil acetatom b) 2- naftil acetatom u kulturi segmenata lukovica *F. meleagris* na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN ili TDZ posle mesec dana gajenja lukovica na 24 °C

Kada su segmenti lukovica gajeni na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN, najveća aktivnost esteraza zabeležena je 28. dana od početka gajenja na ovoj hranljivoj podlozi (izoforme 1 i 2). Posle tri nedelje gajenja segmenata lukovica na hranljivoj podlozi sa TDZ uočava se značajno pojačana aktivnost izoforme 1 sa pI vrednošću od 8,45. Pri ovoj dužini gajenja na istoj hranljivoj podlozi uočena je i maksimalna aktivnost svih 6 izoformi esteraza (Slika 41 a).



a

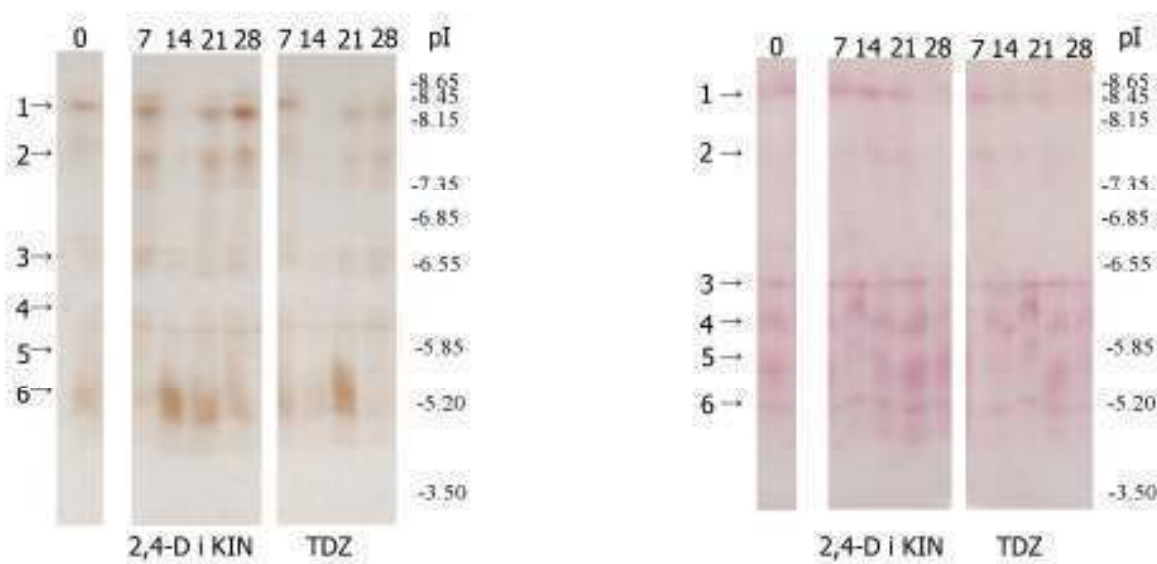
b

Slika 42. Zimografska detekcija esteraza detektovanih sa a) 1-naftil acetatom b) 2- naftil acetatom u kulturi segmenata lukovica *F. meleagris* na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN ili TDZ posle mesec dana gajenja lukovica na 4 °C

U slučaju gajenja lukovica na 4 °C, a zatim izolacije segmenata lukovica i njihovog gajenja na dve hranljive podloge, prisutne su takođe sve izoforme esteraza osim kod segmenata lukovica neposredno posle izolacije (Slika 42). Aktivnost esteraza je izraženija u segmentima lukovica koji su gajeni na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN nego na hranljivoj podlozi sa TDZ. Slabiji intenzitet traka uočava se u segmentima lukovica posle dve nedelje gajenja na hranljivoj podlozi sa TDZ. Uočena je značajno veća aktivnost esteraza u kiselom delu spektra kod segmenata lukovica gajenih na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN tokom celog perioda gajenja, a naročito izoforme 6 sa pI vrednošću između 5,20 i 5,85.

Aktivnost esteraza u segmentima lukovica izolovanim iz lukovica predhodno gajenih na povećanoj koncentraciji saharoze je slabija nego aktivnost esteraza u segmentima izolovanim iz lukovica koje su predhodno gajene pri standardnim uslovima (24 °C, 3% saharoze) ili na nižoj temperaturi (4 °C) (Slika 43 a i b). Nedelju dana posle izolacije segmenata lukovica pojačava se aktivnost izoformi 1 i 6 sa maksimumom aktivnosti 7., 21. i 28. dana u slučaju izoforme 1 i 14. i 21. dana u slučaju izoforme 6 na

hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN. Pojačana aktivnost izoforme 6 uočava se samo 21. dana na hranljivoj podlozi sa TDZ.



a

b

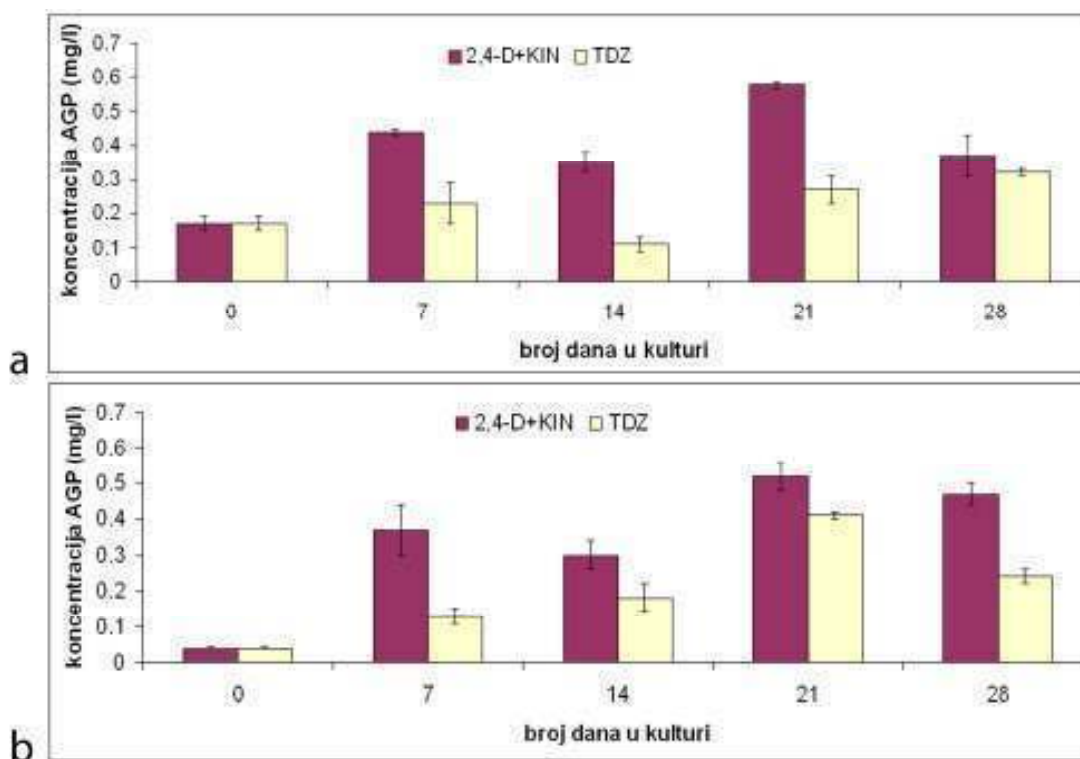
Slika 43. Zimografska detekcija esteraza detektovanih sa a) 1-naftil acetatom b) 2- naftil acetatom u kulturi segmenata lukovica *F. meleagris* na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN ili TDZ posle mesec dana gajenja lukovica na hranljivoj podlozi sa 4,5% saharoze

4.5.3. Kvantifikacija AGP tokom indukcije morfogeneze *in vitro*

Kvantifikacija arabinogalaktanskih proteina izvršena je tokom indukcije morfogeneze *in vitro* na hranljivim podlogama obogaćenim sa 2,4-D i KIN 1 mg/l, svaki odnosno 1 mg/l TDZ u kulturi segmenata lukovica i bazalnih segmenata listova. Jedan deo biljaka prethodno je bio gajen mesec dana na temperaturi od 4 °C. Promena u sadržaju AGP je praćena tokom 4 nedelje gajenja u kulturi.

4.5.3.1. Koncentracija AGP tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi bazalnih delova listova

Koncentracija AGP se povećava već posle 7 dana gajenja bazalnih segmenata listova na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN koje su bile pre indukcije gajene mesec dana na 24 °C. Najveća koncentracija ($0,58 \pm 0,04$ mg/g tkiva) zabeležena je 21. dana posle početka gajenja na ovoj hranljivoj podlozi što predstavlja povećanje od tri puta u odnosu na bazalne segmente lukovica neposredno posle izolacije ($0,17 \pm 0,01$ mg/g tkiva) (Slika 44 a). Na hranljivoj podlozi obogaćenju sa TDZ koncentracija AGP u bazalnim segmentima listova 7. dana raste, a zatim opada da bi 14. dana dostigla najnižu vrednost ($0,11 \pm 0,04$ mg/g tkiva).



Slika 44. Koncentracija arabinogalaktanskih proteina tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi bazalnih segmenata listova. Hranljive podloge sa 2,4-D i KIN ili TDZ korišćene su za indukciju morfogeneze posle gajenja biljaka u trajanju od mesec dana na temperaturi a) 24 °C b) 4 °C.

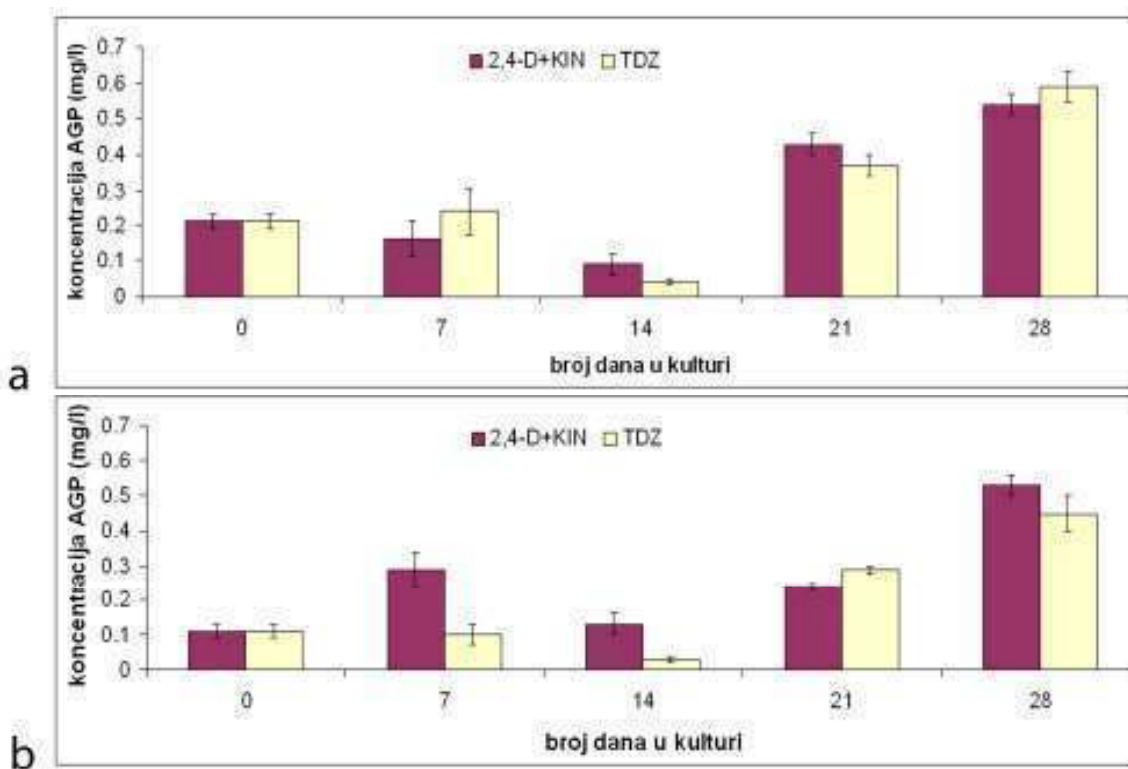
Posle toga koncentracija AGP u tkivu raste i dostiže maksimalnu vrednost ($0,32 \pm 0,02$ mg/g tkiva) 28. dana.

Kod biljaka koje su prethodno gajene na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u bazalnim segmentima listova određena je niža koncentracija AGP ($0,04 \pm 0,001$ mg/g tkiva) nego kada su biljke gajene kontinualno na $24\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tokom indukcije u kojoj su kao početni eksplantati korišćeni bazalni segmenti listova ovih biljaka povećava se koncentracija AGP u tkivu tokom indukcije morfogeneze *in vitro*. Maksimalna koncentracija AGP na obe hranljive podloge 21. dana gajenja u kulturi iznosi $0,52 \pm 0,01$ mg/g tkiva na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i $0,41 \pm 0,04$ mg/g tkiva na hranljivoj podlozi sa TDZ (Slika 44 b).

4.5.3.2. Koncentracija AGP tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenata lukovica

Za razliku od kulture bazalnih segmenata lista koncentracija AGP u kulturi segmenata lukovica se menja tek posle 7 dana gajenja kada dolazi do smanjenja koncentracije AGP i dostijanja minimuma 14. dana, a zatim do naglog povećanja sa maksimumom 28. dana gajenja i to na oba induktivna tretmana (Slika 45 a). Najveća koncentracija AGP u kulturi segmenata lukovica posle gajenja lukovica detektovana je 28. dana od početka indukcije na hranljivoj podlozi sa TDZ i iznosila je $0,59 \pm 0,04$ mg/g tkiva.

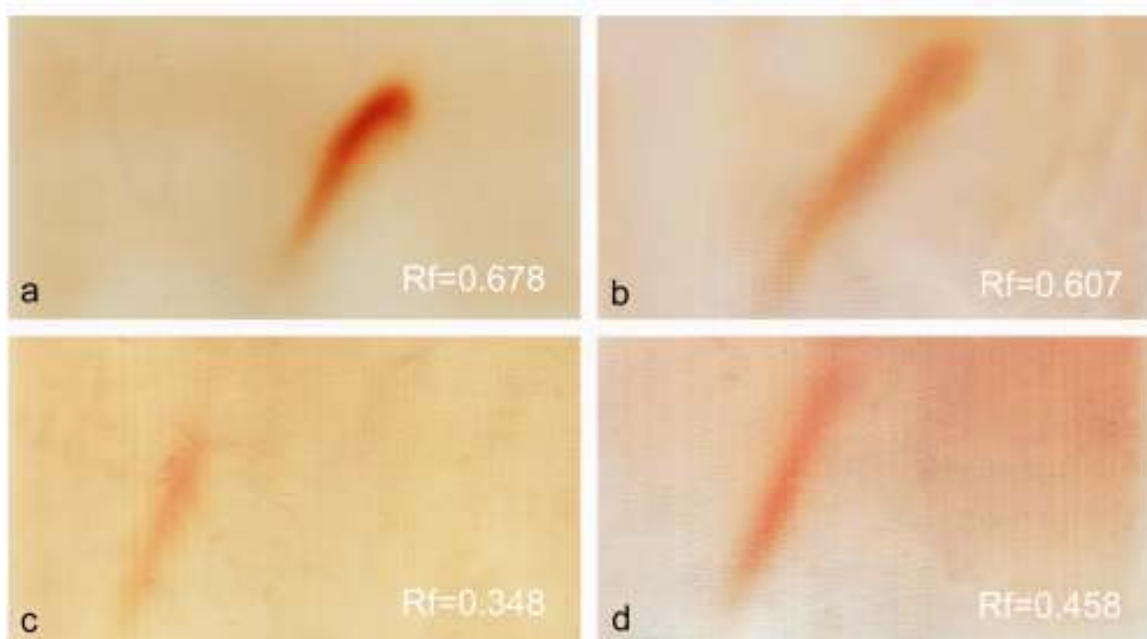
Kao i u kulturi bazalnih delova listova i u kulturi segmenata lukovica zabeležena je niža koncentracija AGP kod segmenata lukovica predhodno gajenih na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ u odnosu na lukovice kontinualno gajene na $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ i to na obe hranljive podloge. Na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN 7. dana se zapaža povećanje koncentracije AGP u tkivu koja opada posle 14. dana, a zatim do kraja posmatranog perioda raste dostižući maksimum 28. dana ($0,53 \pm 0,03$ mg/g tkiva). Na hranljivoj podlozi sa TDZ u segmentima lukovica detektovana je snižena koncentracija AGP na početku gajenja, dok posle toga dolazi do povećanja koncentracije i maksimum se dostiže takođe 28. dana, a iznosi $0,45 \pm 0,05$ mg/g tkiva (Slika 45 b).



Slika 45. Koncentracija arabinogalaktanskih proteina tokom indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenat lukovica. Hranljive podloge sa 2,4-D i KIN ili TDZ korišćene su za indukciju morfogeneze posle gajenja biljaka u trajanju od mesec dana na temperaturi a) 24 °C b) 4 °C.

4.5.3.3. Dokazivanje AGP ukrštenom elektroforezom tokom indukcije morfogeneze *in vitro*

Analiziran je elektroforetski profil AGP izolovanih iz lukovica *F. meleagris* gajenih tokom četiri nedelje gajenja na dve hranljive podloge, a zatim upoređivan sa profilom gumiarabike kao standardom (Slika 46). Na osnovu kretanja proteina u prvom elektroforetskom gelu određena je Rf vrednost koja je za gumiarabiku iznosila 0,678 (Slika 45 a).



Slika 46. Elektroforetski profil arabinogalaktanskih proteina dobijen metodom ukrštene elektroforeze. a) gumiarabika b-d) AGP izolovani iz tkiva *F. meleagris* tokom indukcije morfogeneze *in vitro*.

Na osnovu rezultata možemo zaključiti da je u tkivima izolovanom na različitim tretmanima tokom indukcije morfogeneze *in vitro* prisutan samo jedan tip AGP čija molekulska masa varira (Slika 46 b, c, d).

Tokom prve četiri indukcije morfogeneze *in vitro* nije detektovan specifičan tip AGP.

5. DISKUSIJA

5.1. Regeneracija košutice *in vitro*

Većina geofita se razmnožava veoma sporo u prirodnim uslovima pa su tehnike kulture tkiva neophodne za prevazilaženje ovog problema (Ziv i Lilien Kipins, 2000). Step en uspešnosti regeneracije biljaka *in vitro* zavisi od razvojnog stadijuma biljke, sastava hranljive podloge, kombinacije regulatora raste nja i tehnika koje se koriste u kulturi tkiva.

Veoma veliki značaj za uspešnu regeneraciju *in vitro* ima izbor početnog eksplantata (Krishnaraj i Vasil, 1995; Petrić i sar., 2011). Kao početni eksplantati u većini protokola za indukciju morfogeneze *in vitro* vrsta roda *Fritillaria* korišćeni su segmenti lukovica, zigotski embrioni, bazalni segmenti lista, kao i delovi cveta i stabla. Za razliku od kulture vegetativnih i generativnih delova biljaka odabranih genotipova kod kojih je potrebno dobijanje uniformnog genetičkog materijala, kultura zrelih zigotskih embriona predstavlja uspešan metod za regeneraciju biljka u cilju očuvanja biodiverziteta.

5.1.1. *In vitro* morfogeneza u kulturi zrelih zigotskih embriona *F. meleagris* L.

U kulturi zrelih zigotskih embriona kod *F. meleagris* morfogeneza *in vitro* bila je uspešna na hranljivoj podlozi sa TDZ kao i na hranljivoj podlozi bez regulatora raste nja. Ostale hranljive podloge koje su sadržale IAA, BAP, 2,4-D i KIN do vodile su do kalusiranja početnog eksplantata i nisu bile odgovarajuće za indukciju morfogeneze ove vrste. Umnožavanje lukovica i izdanaka iz embriogenog kalusa postignuto je na hranljivoj podlozi sa TDZ. Umnožavanje izdanaka *Acampe praemorsa* (Nayak i sar., 1997) i *Lilium longiflorum* (Nhut i sar., 2002) takođe je postignuto na hranljivoj podlozi obogaćenoj sa TDZ.

Regeneracija lukovica iz embriogenog kalusa u kulturi zrelih zigotskih embriona postignuta je kod *F. alburyana* i *F. whittallii* (Ozcan i sar., 2007). Hranljiva podloga koja je korišćena za regeneraciju kod ove dve vrste bila je N6 hranljiva podloga obogaćena sa 2,4-D. Embriogeni kalus *F. ussuriensis* gajen je na MS hranljivoj podlozi sa NAA (2 mg/l), BAP (0,5 mg/l) ili 2,4-D (2 mg/l) i iz njega je regenerisan veliki broj lukovica (Sun i sar.,

2008). Xue i sar. (2008) regenerisali su lukovice iz embriogenog kalusa *F. anhinensis* koristeći MS hranljivu podlogu sa KIN (2 mg/l) i NAA (2 mg/l). Zigotski embrioni *Sternbergia fischeriana* su gajeni na MS hranljivoj podlozi obogaćenoj sa NAA i BAP gde dolazi do formiranja embriogenog kalusa kao i do regeneracije izdanaka i lukovica (Mirici i sar., 2005). Pored organogeneze, gajenjem zigotskih embriona *S. fischeriana* na MS hranljivoj podlozi sa 2,4-D, dolazi i do formiranja velikog broja somatskih embriona.

Formiranje i diferencijacija somatskih embriona u kulturi zigotskih embriona postignuta je na hranljivoj podlozi sa TDZ kao i na hranljivoj podlozi bez regulatora rastjenja s tim što je veći broj somatskih embriona formiran na hranljivoj podlozi sa TDZ. Embriogeni kalus formira se u kulturi zigotskih embriona šargarepe takođe na hranljivoj podlozi bez regulatora rastjenja (Smith i Krikorian, 1990). Zigotski embrioni kao početni eksplantati korišćeni su za indukciju malog broja vrsta roda *Fritillaria*. Kod *F. meleagris* somatske embriogeneze dobijena je na hranljivoj podlozi sa 2,4-D ili TDZ u koncentraciji od 1 mg/l, svaki (Subotić i sar., 2010) i kod *F. alburyana* na MS podlozi obogaćenoj sa BAP i NAA odnosno N6 podlozi sa 2,4-D (Ozcan i sar., 2007). Indukcija somatske embriogeneze iz zigotskih embriona na hranljivoj podlozi sa 2,4-D postignuta je kod *Allium aflatunense* (Subotić i sar., 2006), *Allium sativum* (Luciani i sar., 2006) i pirinča (Meneses i sar., 2005). TDZ je korišćen za indukciju somatske embriogeneze kod *Acacia magnum* na hranljivoj podlozi sa koncentracijama ovog regulatora rastjenja od 1 do 2 mg/l gde izaziva formiranje zeleno žutog embriogenog kalusa (Xie i Hong, 2001). Citokinini potpomažu regeneraciju biljaka *in vitro*, dok TDZ pored uloge slične citokininima ima i ulogu modulatora endogenog nivoa auksina (Hutchinson sar., 1996), a auksini igraju važnu ulogu u indukciji somatske embriogeneze (Visser i sar., 1996).

Novonastale lukovice *F. meleagris* gajene su na hranljivoj podlozi bez regulatora rastjenja na standardnoj temperaturi (24 °C) i na temperaturi od 4 °C u cilju ispitivanja uticaja niske temperature na dalje rastjenje i razviće lukovica. Gajenjem lukovica na temperaturi od 4 °C u trajanju od 4 nedelje povećava se procenat ožiljavanja lukovica (60,4%) u odnosu na lukovice gajene na standardnoj temperaturi kod kojih je iznosio 32,4%. Broj korenova i dužina biljke su takođe bili značajno veći kod biljaka gajenih na 4 °C. Posle hlađenja biljke su gajene još 4 nedelje na standardnoj temperaturi. Dužina kao i

broj korenova bili su veći kod biljaka koje su prethodno gajene na 4 °C. Niska temperatura povećava procenat klijanja lukovica i ožiljavanje što je pokazano i kod drugih geofita kao što je ljiljan (Langens-Gerrits i sar., 2003). Pozitivan uticaj gajenja lukovica na niskim temperaturama uočen je i kod *Dioscorea polystachya* gde se procenat ožiljenih lukovica kreće između 71 i 99% u odnosu na lukovice koje nisu hladene i kod kojih je procenat ožiljavanja bio samo 9% (Walck i sar., 2010).

Ispitivan je i uticaj povećane koncentracije saharoze u hranljivoj podlozi na prirast mase lukovica *F. meleagris*. Najveći prirast mase uočen je na koncentraciji saharoze od 4,5% na obe ispitivane temperature. Povećana koncentracija saharoze u hranljivoj podlozi pozitivno utiče na broj i masu novoformiranih lukovica i kod *F. thunbergii* (Seon i sar., 1999). Kod ove vrste formira se 11,3 lukovice po eksplantatu na koncentraciji saharoze od 5% u hranljivoj podlozi, dok se masa lukovica uvećava od 5 do 7 puta ukoliko se lukovice gaje na hranljivoj podlozi sa 5 % odnosno 7% saharoze. Sličan efekat je dobijen i kod ljiljana gde je uočeno da je povećanje suve mase lukovica u korelaciji sa povećanjem koncentracije saharoze u hranljivoj podlozi (Langens-Gerrits, 2003c). Isti autori navode da krupnije lukovice imaju veći prirast mase na nižim koncentracijama saharoze u hranljivoj podlozi, dok manje lukovice brže rastu na višim koncentracijama saharoze. Pretpostavlja se da je usvajanje saharoze iz hranljive podloge intenzivnije na višim temperaturama, pa se samim tim i masa lukovica povećava na tim temperaturama (Yamagishi, 1997). Na niskim temperaturama može doći do slabljenja funkcije korena i na taj način akumulacija šećera može biti manja (Yamagishi, 1993). Pored toga, na višim temperaturama aktivniji su i enzimi koji razlažu saharozu. Smatra se da određene ekstracelularne kisele invertaze koje se transportuju u okolnu hranljivu podlogu dovode do razlaganja saharoze na glukozu i fruktozu (Masuda i sar., 1988). Kada se lukovice *F. meleagris* gaje mesec dana na standardnoj temperaturi posle gajenja na 4 °C, prirast mase je najveći kod lukovica gajenih na hranljivoj podlozi sa 4,5% saharoze. Dormancija lukovica koja je prekinuta tokom hlađenja dovodi do pojačanih metaboličkih procesa koji mogu dovesti do intenzivnijeg usvajanja saharoze iz hranljive podloge pa samim tim i do povećanja njihove mase.

Posle gajenja na niskoj temperaturi, kod ožiljenih lukovica određen je sadržaj vode, šećera, poliola i fotosintetičkih pigmenata. Kod lukovica koje su gajene na 4 °C primećen

je porast sadržaja vode, glukoze, fruktoze i poliola. Tokom gajenja lukovica na standardnoj temperaturi dolazi do smanjenja koncentracije šećera u lukovicama *F. meleagris*, što je takođe primećeno i kod lukovica ljiljana u kojima je naglo smanjen sadržaj šećera neposredno posle sađenja, kada se pripremaju za klijanje (Miller i Langhaus, 1990). Veoma važna promena koja se dešava u lukovicama tokom perioda gajenja na 4 °C, je promena u sadržaju ugljenih hidrata (Galiba i sar., 1997). Šećeri imaju ulogu u zaštiti lukovica geofita od raznih vrsta abiotičkog stresa (u koje spada i delovanje niskih temperatura) na taj način što deluju kao osmoregulatori (Hendry, 1993). Ugljeni hidrati u lukovicama su pretežno akumulirani u vakuolama gde se i dešava njihova sinteza (Frehner i sar., 1984) ali je njihova fiziološka i biohemijska uloga još uvek nedovoljno rasvetljena. Kada se lukovice ljiljana gaje na niskim temperaturama, dolazi do hidrolize skroba i nakupljanja velike količine saharoze (Shin i sar., 2002). Saharoza predstavlja glavni šećer u lukovicama *F. meleagris*, dok je sadržaj glukoze i fruktoze daleko manji. U lukovicama crnog luka sadržaj šećera se kreće od 65 do 85% i ti šećeri predstavljaju glavni izvor rezervnih materija. Veliki deo šećera kod ove vrste čini glukoza, fruktoza i saharoza (Shiomi i sar., 2005). Koncentracija saharoze, koja je zastupljeniji šećer u odnosu na glukozu i fruktozu u lukovicama *F. meleagris*, ne menja se značajno tokom perioda gajenja na 4 °C u odnosu na one lukovice gajene na standardnoj temperaturi. Ovi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima Shin i sar. (2002) koji su takođe potvrdili da je saharoza najzastupljeniji šećer u lukovicama *Lilium*. Saharoza igra važnu ulogu u rastenju i razviću biljaka i proizvodi njene degradacije mogu biti signali za prekid dormancije i početak klijanja (Benkeblia 2008). Dormantne lukovice su fiziološki aktivne, ali mnogo manje u odnosu na nedormantne lukovice. Priprema lukovica za klijanje tesno je povezana sa razlaganjem polisaharida do disaharida i monosaharida (Benkelbia i sar., 2003). Hidroliza šećera se obično dešava na samom početku hlađenja, u toku prve nedelje, da bi pred početak kljivanja lukovica crnog luka, sadržaj redukujućih šećera (glukoze i fruktoze) bio najveći (Shiomi i sar., 2005). Hidrolizu šećera katalizuje enzim invertaza čija je aktivnost smanjena kod lukovica luka koje su se spremale za period dormancije (Shiomi, 1993). Šećeri koji se akumuliraju u lukovicama tokom hlađenja, u ovom slučaju glukoza i fruktoza, služe kao rezerva za naredni period u kom će lukovice klijati kao i za pokretanje

fotosintetičkog aparata kada se završi period dormancije (Miller i Langhaus, 1990). Posle klijanja lukovice, rezervni ugljeni hidrati u spoljašnjim slojevima lukovice ljljana počinju da se hidrolizuju. Skrob se akumulira u središnjem sloju lukovice i smatra se da njegova hidroliza značajno pomaže klijanju (Langens-Gerrits i sar., 2003). U krtolama krompira takođe je dokazana povećana akumulacija skroba koje je predhodnica klijanja (Sarkar, 2008). Sadržaj poliola u lukovicama *F. meleagris* je više od dva puta veći u lukovicama koje su hlađene. Polioli povećavaju toleranciju ka raznim vrstama abiotičkog stresa (Kaplan i sar., 2004). Povećanje količine vode u lukovicama može biti povezano sa njenom ulogom u degradaciji skroba koja se intenzivno odigrava tokom hlađenja lukovica kao što je pokazano kod narcisa (Kamenetsky i sar., 2003).

Koncentracija hlorofila se smanjuje kod lukovica *F. meleagris* koje su bile gajene na niskoj temperaturi, dok se sadržaj karotenoida povećava. Sadržaj hlorofila smanjuje se kada su biljke crvenog bibera izložene različitim vrstama stresa (Kim i sar., 2004). Tokom dormancije krompira, fotosinteza se slabije odvija pa je samim tim sadržaj pigmenata manji (Kim i sar., 2002). Slični rezultati dobijeni su i kod lukovica košutice, kod kojih se posle naglog pada aktivnosti fotosintetičkih pigmenata tokom hlađenja, njihov sadržaj povećava kada se lukovice ponovo gaje na standardnoj temperaturi i proces fotosinteze nastavi neometano da se odvija. Karotenoidi učestvuju u brojnim antioksidativnim reakcijama koje se odvijaju u stresnim situacijama (Edge i sar., 1997) i uključeni su u odbranu fotosistema II od štetnog uticaja slobodnih radikala (Gilamore, 1997) pa se njihova koncentracija povećava tokom hlađenja.

5.1.2. Indukcija morfogeneze *F. meleagris* L. kod lukovica formiranih *in vitro*

Segmenti lukovica kao i bazalni delovi lista, mogu se koristiti kao početni eksplantati za indukciju morfogeneze vrsta roda *Fritillaria*, ali su veoma podložni infekcijama (Witomska i Lukaszewska, 1997). Korišćenjem delova lukovica formiranih *in vitro* kao početnih eksplantata prevazilazi se problem sa kontaminacijom biljnog materijala i može se značajno povećati broj regenerisanih biljaka.

U kulturi segmenta lukovica košutice formiranih *in vitro* postignuta je indukcija somatske embriogeneze i organogeneze na hranljivim podlogama koje su sadržale 2,4-D i

TDZ. Direktna somatska embriogeneza postignuta je na segmentima lukovice gajenim na svetlosti ili u mraku na obe ispitivane hranljive podloge.

Na hranljivoj podlozi sa 2,4-D najveći broj somatskih embriona formirao se na koncentraciji od 1 mg/l prilikom gajenja na svetlosti. Najveći broj somatskih embriona na hranljivoj podlozi sa TDZ formirao se na koncentraciji od 0,2 mg/l u istim uslovima gajenja kultura. Formiranje somatskih embriona u mraku prati isti trend kao i formiranje somatskih embriona na svetlosti, samo što je broj formiranih embriona manji u mraku. Za razliku od *F. meleagris* kod *Lilium ledebourii* ne formiraju se somatski embrioni pri istim eksperimentalnim uslovima (Bakhshaie i sar., 2010). Hranljiva podloga obogaćena sa 2,4-D i KIN korišćena je za indukciju somatske embriogeneze na segmentima lukovica kod *F. palidiflora* (Hao i sar., 1982). Embriogeni kalus dobijen je na segmentu lukovice *F. hupehensis* kada je korišćena kombinacija NAA i BAP (Shiau i sar., 2000).

Različite koncentracije ovih regulatora rasteња ne dovode samo do formiranja somatskih embriona, već i do formiranja lukovica na istom eksplantatu (Petrić i sar., 2011).

Najveći broj lukovica regenerisan je na svetlosti i to na koncentracijama 2,4-D nižim od 0,1 mg/l. Hranljiva podloga obogaćena sa TDZ bila je pogodna za regeneraciju lukovica koje su se takođe bolje regenerisale na svetlosti i to na koncentraciji od 1 mg/l gde je formiran i najveći broj lukovica (2,76 lukovica po eksplantatu). Regeneracija lukovica ljljana takođe je bila bolja na svetlosti, ali su za razliku od košutice, lukovice ljljana regenerisane u mraku bile krupnije od lukovica formiranih na svetlosti (Gerrits i De Klerk, 1992). Broj regenerisanih lukovica košutice je značajno manji od broja regenerisanih lukovica *F. thunbergii* formiranih u kulturi segmenta lukovica na MS hranljivoj podlozi sa NAA i KIN (Paek i Murthy, 2002). Wawrosch i sar. (2001) uspešno su indukovali veliki broj regenerisanih lukovica (7) na segmentima lukovice *Lilium nepalense* gajenih na hranljivoj podlozi sa TDZ. Broj novoformiranih lukovica *F. meleagris* je veći od broja novonastalih lukovica *Lilium ledebourii* regenerisanih na hranljivoj podlozi sa TDZ korišćenjem istih početnih eksplantata (Bakhshaie i sar., 2010). Lukovice *Sternberia fischeriana* se najbolje regenerišu na hranljivoj podlozi sa NAA i BAP (oko 3 lukovice po eksplantatu), dok se u prisustvu TDZ smanjuje broj novoformiranih lukovica (Mirici i sar., 2005). Indukcija organogeneze košutice postignuta je i na hranljivoj podlozi bez regulatora

rastenja. Slični rezultati su dobijeni i kod različitih *Lilium* hibrida kada su segmenti lukovica gajeni na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja (Haensch, 1996). Koncentracija regulatora rastenja koja se dodaje u hranljivu podlogu značajno utiče na broj regenerisanih lukovica *F. thunbergii* (Seon i sar., 1999) što je pokazano i u slučaju *F. meleagris*. Najčešće korišćeni regulatori rastenja su bili NAA, IAA i BAP. Kukulezanka i sar. (1989) uspešno su regenerisali lukovice *F. meleagris* na MS i FA hranljivoj podlozi sa NAA i BAP u koncentraciji od 2, odnosno 1 mg/l dobivši 6 novonastalih lukovica po eksplantatu. Kod *F. hupehensis* uspešna regeneracija (72%) postignuta je na hranljivoj podlozi sa NAA (0,25 mg/l) i BAP (0,5 mg/l) (Chen i sar., 2000). Povećane koncentracije NAA i BAP (1 odnosno 2 mg/l) bile su neophodne za uspešnu regeneraciju lukovica *F. cirrosa* (Chen i sar., 1993).

Broj regenerisanih lukovica košutice veći je u uslovima svetlosti na obe ispitivane hranljive podloge. Manji broj lukovica regenerisan je u mraku i kod *F. imperialis* na MS hranljivoj podlozi sa NAA i BAP u koncentraciji od 0,5 i 1 mg/l (Witomska i Lukaszewska, 1997). Na MS hranljivoj podlozi sa NAA i KIN regenerisano je 12 lukovica *F. thunbergii* po eksplantatu na svetlosti, dok je samo 8 lukovica regenerisano na istoj hranljivoj podlozi u uslovima mraka (Paek i Murthy, 2002). Regeneracija lukovica kod *Lilium* bila je bolja u mraku (Niimi i Onozawa, 1979; Leshem i sar., 1982). Kod *Hyacinthus*, uticaj svetlosti i mraka je zavistan od ispitivanog kultivara (Kim i sar., 1981).

U kulturi bazalnih delova lista *in vitro* formiranih lukovica *F. meleagris* uspešno je indukovana direktna somatska embriogeneza. Ispitivan je uticaj različitih koncentracija 2,4-D i KIN, kao i njihovih kombinacija na formiranje i diferencijaciju somatskih embriona. U prisustvu 2,4-D, kao jedinog regulatora rastenja najveći broj somatskih embriona formirao se na najnižoj koncentraciji. Na hranljivoj podlozi obogaćenoj samo sa KIN formira se znatno manji broj somatskih embriona. Dodatkom 2,4-D u podlogu sa KIN stimuliše se proces formiranja somatskih embriona i dostiže maksimum (9,81) pri koncentraciji od 1 mg/l oba regulatora rastenja. Pored toga, u kulturi delova baze lista košutice na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja uočen je značajan procenat indukcije somatske embriogeneze. Ovaj fenomen može se objasniti uticajem gajenja eksplantata na hranljivim podlogama sa regulatorima rastenja u prethodnoj subkulturi. Pored toga zabeležena je i

spontana regeneracija somatskih embriona i lukovica kod ove vrste i u kulturi zrelih zigotskih embriona (Subotić i sar., 2010; Petrić i sar., 2011).

Somatska embriogeneza u kulturi bazalnih delova lista uspešno je indukovana na hranljivoj podlozi sa auksinima i citokininima kod mnogih vrsta (Wang i Bhalla, 2004; Kumar i sar., 2008). Potpuno formirani somatski embrioni uočavaju se posle 28 dana od početka indukcije somatske embriogeneze. Auksini i citokinini smatraju se ključnim faktorima koji dovode do ispoljavanja ćelijske kompetentnosti i indukcije somatske embriogeneze (Fehér, 2003). Baze lista su pogodan materijal za indukciju somatske embriogeneze košutice. Kombinacija auksina i citokinina pokazala se kao odgovarajuća za indukciju somatske embriogeneze mnogih biljaka sa rizomom i lukovicom kao što su *Alstroemeria* (Kim i sar., 2006), *Iris* (Shibli i Ajlouni, 200) i narcis (Ptak i Bach, 2007). Auksin koji se najčešće koristi za indukciju somatske embriogeneze je 2,4-D i skoro 65% protokola uspostavljenih do sada uključuje ovaj auksin (Karami i Saidi, 2010). Smatra se da je formiranje embriogenih ćelija povezano sa hipermetilacijom DNK u prisustvu 2,4-D (Leljak-Levanić i sar., 2004). U ovom procesu, 2,4-D se može ponašati kao auksin direktno ili uticati na intracelularni nivo IAA delujući kao stresni faktor (Fehér i sar., 2003). Njegov uticaj na somatsku embriogenezu je jači od uticaja endogenog auksina jer se kao sintetski auksin ne može metabolisati u ćeliji, a egzogeno primenjen deluje kao stresor, mnogo više nego kao auksin, dovodeći do oksidativnog stresa (Pfeiffer i Hoftberger, 2001). Poznato je da je 2,4-D uključen u indukciju mnogih gena vezanih za stres (Park i sar., 2007). Procenat indukcije i brzina diferencijacije somatskih embriona u prisustvu auksina zavisi od vrste (Von Arnold i sar., 2002).

Anatomskim istraživanjima odredili smo poreklo somatskih embriona u kulturi baze lista. Somatski embrioni košutice se formiraju direktno na eksplantatu, deobama ćelija epidermalnog i subepidermalnog sloja lista. Tako se na poprečnom preseku eksplantata, posle 8 dana gajenja na MS hranljivoj podlozi obogaćenoj sa 0,1 mg/l uočavaju meristemski centri. Meristemske ćelije koje su zaslužne za formiranje somatskih embriona u ovim slojevima opisao je Haccius (1978) i nazvao ih proembriogeni ćelijski kompleksi. Isti autor ukazuje da indukovani somatski embrioni nastaju po pravilu od jedne ćelije pa se direktna somatska embriogeneza može iskoristiti za izučavanje tranzicije somatskih u

embriogene ćelije. Daljim inekvalnim deobama ovih meristemskih ćelija formira se polarizovana osa globularnog somatskog embriona. Somatski embrion nastavlja da se razvija i prolazi kroz srcasti i kotiledonarni stadijum razvića sa potpuno odvojenim vaskularnim vezama od matičnog eksplantata (Subotić i sar., 2010). Proces somatske embriogeneze u kulturi baze lista košutice je direktan, a embrioni su višećelijskog porekla.

5.2. Prevazilaženje dormancije lukovica

Geofite preživljavaju nepovoljan period godine u formi lukovice koja se nalazi pod zemljom i postaje dormantna (Kamenetsky i sar., 2003). Na taj način provode nepovoljan period godine (Vegis, 1964). Dormancija može biti prekinuta periodom izlaganja lukovica niskim temperaturama tokom određenog vremena da bi imale efekta i da bi lukovica počela da klija (Bewley, 1997).

Uticaj niskih temperatura na prevazilaženje dormancije kod lukovica regenerisanih *in vitro* zabeležen je kod *Lilium* (Shin i sar., 2002; Langens-Gerrits i sar., 2003), *Lachenalia* (Slabbert i Niederwieser, 1999), *Allium* (Specht i Keller, 1997; Yamazaki i sar., 2002), narcisa (Hulscher i sar., 1992). Lukovice *Lilium* regenerisane *in vitro* postaju dormantne i mogu da klijaju tek posle određenog vremena koje provedu na niskim temperaturama iznad 0 °C (Langens-Gerrits i sar., 2003a). Lukovice *F. meleagris* regenerisane *in vitro* su takođe dormantne i period niskih temperatura povoljno utiče na prekid dormancije. Tokom perioda gajenja lukovica na temperaturi od 4 °C, regeneracija lukovica je veoma slaba, dok se na temperaturi od 15 °C broj regenerisanih lukovica znatno povećava. Prirast mase tokom različite dužine trajanja hlađenja na dve različite temperature bio je najveći kod lukovica koje su 6 nedelja gajene na temperaturi od 4 °C. Efekat niskih temperatura se vidi posle mesec dana gajenja na standardnoj temperaturi kada se broj regenerisanih lukovica gajenih na 4 i 15 °C povećava u odnosu na lukovice koje su konstantno bile na standardnoj temperaturi. U većini slučajeva, što je zahtev za periodom niskih temperatura duži, što zavisi od vrste, to su klijanje, rastenje korenova i listova brži i bolji. Dužina perioda niskih temperatura potrebna za klijanje 100 % lukovica zavisi od nivoa dormancije cele populacije (Delvalle i sar., 1990; De Klerk i sar., 1992; Langens-Gerrits i sar., 2001). Dalje produžavanje vremena hlađenja koje bi bilo duže od optimalnog,

nema efekta na pomenute parametre, a neretko ima i negativan uticaj. Tretman niskim temperaturama pozitivno utiče na formiranje lukovica kod narcisa (Hulscher i sar., 1992). Lukovice narcisa koje rastu u prirodnim uslovima zahtevaju dug period niskih temperatura da bi biljke dostigle potrebnu dužinu stabla, formirale cvet kao i za produkciju novih lukovica na matičnoj lukovici (Saniewski i Okubo, 2005). Lukovice košutice regenerisane na 15 °C imaju manji prirast mase posle 4 nedelje slično lukovicama ljiljana kod kojih je suva masa lukovica regenerisanih na 15 °C pokazivala manje vrednosti u odnosu na lukovice koje su izlagane nižim temperaturama (4 °C) (De Klerk, 2009). Dužina trajanja hlađenja različita je od vrste do vrste, čak i kod različitih sorti iste vrste (Langens-Gerrits i sar., 2001). Lukovice košutice koje su hlađene klijale su u većem procentu od onih koje su gajene na standardnoj temperaturi. Ledesma i sar. (1980) objavljuju da lukovice belog luka ne klijaju nakon sađenja, usled dormancije, ali se klijavost naglo povećava ukoliko se određeno vreme čuvaju na niskim temperaturama. Klijavost lukovica belog luka formiranih *in vitro* je takođe slaba i one su dormantne (Moriconi i sar., 1990). Gajenje lukovica *Dioscorea polystachya* na niskoj temperaturi (od 12 do 18 nedelja) u kulturi kao i u prirodnim uslovima pozitivno utiče na njihovo klijanje (Walck i sar., 2010), kao i na prekid dormancije (Okagami i Tanno 1991). Lukovice ljiljana koje klijaju bez prethodnog tretmana niskim temperaturama formiraju samo slabo razvijene listove, bez stabla (Langens-Gerrits i sar., 1997). Langens-Gerrits i sar. (2003b) smatraju da je niska temperatura potrebna za prelaz lukovica iz juvenilnog u adultno stanje kada mogu da formiraju stablo i cvetaju. Za prelaz iz juvenilne faze potrebna je određena veličina lukovice koja je različita od vrste do vrste (Le Nard i De Hertogh, 1993).

Lukovice *F. meleagris* koje su gajene na 4 °C tokom 4 nedelje uspešnije se aklimatizuju na uslove staklenika od lukovica koje nisu bile na tretmanu niskim temperaturama. Lukovice ljiljana koje su bile na temperaturi od 5 °C tokom 6 nedelja uspešno su aklimatizovane i rasle su mnogo brže od lukovica koje nisu bile na niskoj temperaturi (Langens-Gerrits i sar., 2000).

Tretiranjem lukovica sa GA₃ vidi se da je najveći broj regenerisanih lukovica kao i najveći prirast mase bio na kontrolnim lukovicama koje su bile hlađene 5 nedelja i nisu bile pod uticajem giberelina. Najveći broj regenerisanih lukovica bio je 4 nedelje posle gajenja

lukovica 5 nedelja na 4 °C i pretretmanu sa 1 mg/l GA₃. Najveći prirast mase 4 nedelje posle hlađenja bio je kod biljaka koje su bile gajene 5 nedelja na niskoj temperaturi i nisu tretirane sa GA₃. Najveći broj lukovica klijao je mesec dana posle gajenja lukovica 4 nedelje na temperaturi od 4 °C i pretretmanu sa GA₃ (1 mg/l) slično rezultatima na *Lilium speciosum* (Kim, 1991) gde je optimalna koncentracija GA₄₊₇ koja dovodi do prekida dormancije bila takođe 1 mg/l, dok GA₃ nije imao efekta. Klijanje lukovica može se pospešiti kratkim tretmanom giberelinima (Niimi i sar., 1988). Lukovice košutice koje su tretirane giberelinom ne nastavljaju da rastu posle klijanja ili rastu veoma sporo. Lukovice *Lilium speciosum* takođe ne rastu nakon klijanja kada su tretirane giberelinom (Gerrits i sar., 1992), mada mogu klijati iako prethodno nisu hlađene (Kim, 1991). Procenat klijanja povećava se kod lukovica koje su tretirane giberelinom, što je potvrđeno i kod *Allium sativum* (Rahman i sar., 2006) gde je najveći procenat klijanja postignut na koncentraciji od 250 ppm GA₃. Usporen rast lukovica koje nisu hlađene govori da je efekat giberelina na klijanje lukovica neupotrebljiv ukoliko lukovice nisu određeno vreme gajene na niskim temperaturama. GA₃ može nadomestiti nedostatak niskih temperatura određeno vreme, ali ne u potpunosti. Može se zaključiti da GA₃ utiče na prekid dormancije u smislu početka klijanja lukovica, ali za njihov dalji rast i formiranje listova potrebno je delovanje niskih temperatura. Smatra se da je transport giberelina tokom dormancije sprečen (Rohde i Bhalerao, 2007), ali je način na koji se transport ponovo uspostavlja još uvek nejasan. Prirast mase lukovica tretiranih giberelinom posle hlađenja se slabo povećava ukoliko su lukovice bile na koncentraciji giberelina ispod 3 mg/l, što govori da lukovice koje u najvećem procentu klijanju na koncentraciji od 1 mg/l GA₃ veoma sporo rastu. Iz navedenog se može zaključiti da su prekid dormancije lukovica košutice (klijanje lukovica) i njihov dalji rast dva zasebna procesa. Slični rezultati objavljeni su kod ljiljana (Langens-Gerrits i sar., 2003c). Isti autori navode da kod lukovica tretiranih giberelinom nema hidrolize šećera koja se normalno dešava prilikom dormancije lukovica, što potvrđuje teoriju da giberelini nisu jedini faktor potreban za prekid dormancije lukovica. Određena količina hidrolizovanih šećera mora se skladištiti u lukovici tokom minimalnog perioda niskih temperatura što je u slučaju lukovica košutice 4 nedelje, da bi lukovice imale dovoljno energije da klijanju i rastu posle prekida dormancije. Proces klijanja semena i kasnijeg rasta

klijanca *Arabidopsis* su takođe dva odvojena procesa regulisana različitim metaboličkim putevima (Pritchard i sar., 2002). Činjenica da samo giberelini koji su primenjeni u kratkom periodu ne mogu prekinuti dormanciju na pravi način tj. dovesti do rasta lukovice posle klijanja, može se objasniti kratkim vremenom tokom koga se ne mogu skladištiti šećeri potrebni za kasniji rast lukovice. Period niskih temperatura u trajanju od nekoliko nedelje pruža dovoljno vremena za hidrolizu šećera.

5.3. Uloga antioksidativnih enzima u prevazilaženju dormancije lukovica

Analiza aktivnosti antioksidativnih enzima određivana je kod lukovica koje su bile dormantne kako da bi se utvrdila uloga koju ti enzimi imaju u ovom procesu. ROS se proizvode u biljnim tkivima uvek jer su rezultat aerobnog metabolizma, ali njihova preterana proizvodnja je rezultat oksidativnog stresa. Oksidativni stres i akumulacija ROS rezultira pojavom oksidativnih oštećenja (Inze i Montagu, 2002). Mehanizmi koji deluju na biljku tokom njenog boravka na niskim temperaturama još uvek su nepoznati. Smatra se da su glavna mesta oštećenja membrane ćelija (Steponkus, 1984). Jedna od glavnih karakteristika roda *Fritillaria* su lukovice koje skladište hranljive molekule, postaju dormantne i tako preživljavaju tokom zimskih meseci. Većina vrsta cveta u proleće, a najbolji prinos dobija se kada se sade u septembru. Tokom leta nadzemni deo se suši i pod zemljom ostaje lukovica sa formiranim cvetnim pupoljkom. Nove lukovice mogu se formirati na matičnoj lukovici, ali njihov dalji rast i klijanje zahtevaju temperaturu između 2 i 15 °C koja će prekinuti dormanciju (Sun i Wang, 1991).

Nekoliko faktora diktira trajanje odnosno prekid dormancije u lukovicama: smanjeno prisustvo određenih proteina (Higuchi i Sisa, 1967), promene u endogenom nivou giberelina i abscisinske kiseline (Rakhimbaev i sar., 1978; Aung i De Nortogh, 1979; Gorin i Heidema, 1985; Rebers i sar., 1995), amilazno zavisna degradacija skroba (Nowak i sar., 1974; Hobson i Davies, 1977; Banasik i sar., 1980) i vezivanje vode sa velikim molekulima odnosno njeno oslobađanje iz hidratisanih molekula (Yamazaki i sar., 1995; Okubo i sar., 1997; Zemah i sar., 1999).

Povećana koncentracija ROS dovodi do povećane sinteze i aktivnosti antioksidativnih enzima koji deluju kao odbrambeni sistem biljaka, tzv. antioksidativni

sistem. ROS mogu dovesti do smrti ćelije ukoliko je njihova koncentracija u ćeliji veća od one koju ona može efikasno eliminisati sistemom antioksidativnih enzima. ROS mogu aktivirati određene metaboličke procese i na taj način imati ulogu sekundarnog glasnika. Generalno, ROS dovode do kontinuiranog starenja ćelije koje može biti brže ili sporije u zavisnosti od njihove produkcije (Remacle i sar., 1995). Eliminacijom ROS antioksidativnim sistemom, koji se aktivira u uslovima stresa, postiže se bolje rastenje i produkcija biomase. Mnoge biljke postaju manje ili više tolerantne na periode niskih temperatura kroz proces aklimatizacije. Na taj način povećavaju prag tolerancije na niske temperature putem brojnih fizioloških i molekularnih mehanizama (Thomashow, 1999). Jedan od tih mehanizama je i povećana ekspresija gena za antioksidativne enzime.

Kod biljaka se u uslovima stresa obično aktivira više antioksidativnih enzima i na taj način se povećava mogućnost da prežive stres bez velikih oštećenja (Allen, 1995). Po Lukatkin-u (2002) biljke koje brže aktiviraju antioksidativni sistem tokom perioda niskih temperatura i koje ga veoma brzo vraćaju na početni nivo posle zavšetka stresa, smatraju se više rezistentnim na niske temperature. Praćena je spektrofotometrijska aktivnost superoksid dismutaze, glutation reduktaze, ukupnih katalaza i ukupnih peroksidaza u periodu pre, tokom i posle dormancije lukovica *F. meleagris*. Aktivnost antioksidativnih enzima praćena je kod lukovica regenerisanih *in vitro* na temperaturi od 24 i 15 °C na hranljivoj podlozi bez regulatora rastjenja. Regenerisane lukovice podvrgnute su tretmanu hlađenja koji je trajao 8 nedelja. Aktivnost enzima merena je 3 dana posle početka delovanja niske temperature (4 °C), 8 nedelja posle primene te temperature, kao i 7 dana posle završenog tretmana niskom temperaturom *in vitro*, kao i u prirodnim uslovima tokom zime i proleća. Lukovice regenerisane *in vitro* zasađene su u zemlju pa je aktivnost antioksidativnih enzima praćena tokom perioda zime u prirodnim uslovima kao i na početku proleća kada lukovice počinju da klijaju.

Antioksidativni enzimi su najčešći markeri oksidativnog stresa. Međutim, jasna korelacija između aktivnosti antioksidativnih enzima i oksidativnog stresa ne postoji kod svih ispitivanih biljnih vrsta (Seppänen i Fagerstedt, 2000). Kod paradajza nije pronađena veza između aktivnosti antioksidativnih enzima sorte otporne na hladnoću u odnosu na sortu koja je osetljiva (Walker i McKersie, 1993), dok je npr. kod kukuruza dokazano da

ovo enzimi imaju ključnu ulogu u eliminaciji ROS nastalih delovanjem niskih temperatura (Janhke i sar., 1991).

Niske temperature tokom zime najčešće dovode do oksidativnog stresa (Van Camp i sar., 1994). Tokom oksidativnog stresa uslovljenog niskim temperaturama dolazi do povećane produkcije ROS koje negativno utiču na metabolizam ćelije i moraju biti eliminisani antioksidativnim enzimima (Eltner i sar., 1988). Poređenjem TEENALI klona *Camellia sinensis* koji ima kratak period i KANGRA JAT klona koji ima dug period dormancije, utvrđeno je da produženo vreme niskih temperatura dovodi do povećane koncentracije ROS kao odgovora na niske temperature koje su potrebne da bi se prekinula dormancija (Vyas i Kumar, 2005). Kod pomenutih klonova dolazi do povećane aktivnosti antioksidativnih enzima tokom tretiranja niskim temperaturama. Kod klona TEENALI koji ima malu akumulaciju ROS usled kratkog perioda dormancije, GR ima najveću aktivnost (Vyas i sar., 2007). U slučaju ispitivanih lukovica *F. meleagris* GR ima najveću aktivnost kod lukovica regenerisanih na 24 °C koje nisu podvrgnute periodu niskih temperatura pa je samim tim i produkcija ROS minimalna.

Aktivnost svih ispitivanih antioksidativnih enzima košutice, osim glutathion reduktaze, rasla je sa opadanjem temperature. SOD pokazivala je najveću aktivnost posle 8 nedelja gajenja lukovica na 4 °C. Povećanje aktivnosti SOD je u veoma tesnoj korelaciji sa smanjenjem oksidativnog stresa (Martinez i sar., 2001; Alscher i sar., 2002). Pojedine izoforme SOD mogu biti vezane za dormanciju i javljati se samo tokom hladnog perioda. Dokumentovano je da geni za određene izoforme SOD mogu biti aktivirani niskim temperaturama (Tsang i sar., 1991; Kaminaka i sar., 1999; Lee i Lee, 2000; Lee i sar., 1999). Superoksidni anjon koga SOD eliminiše ne može proći kroz ćelijsku membranu tako da je aktivnost različitih izoformi SOD ograničena na organele u kojima se nalaze (Kurepa i sar., 1997). Postoje podaci da se Mn-SOD javlja tokom perioda niskih temperatura na kojima su gajene lukovice *F. meleagris* (Jevremović i sar., 2010). Smatra se da ova izoforma SOD eliminiše ROS koji nagomilavaju tokom oksidativnog stresa izazvanog niskim temperaturama (Vyas i Kumar, 2005). Mn-SOD nalazi se najvećim delom u mitohondrijama, a poznato je da je elektron transportni lanac mitohondrija izvor ROS. Elektron transportni lanac u mitohondrijama je veoma osetljiv na niske temperature i

elektroni koji bi trebalo da budu transportovani do O₂ da bi se dobila voda, formiraju superoksidni anjon (Vandlerberghe i McIntosh, 1992). Pokazano je da postoji snažna korelacija između proizvodnje superoksidnog anjona i aktivnosti SOD kod kukuruza i paradajza (Lukatkin 2002). Mn-SOD je veoma često najaktivnija izoforma SOD u uslovima oksidativnog stresa izazvanog niskim temperaturama. Najveća aktivnost SOD kod *F. meleagris* bila je kod lukovica koje su gajene pet meseci u zemlji tokom zime, što može biti povezano sa povećanom aktivnošću Mn-SOD. Pokazano je da Mn-SOD kod lucerke ima pojačanu aktivnost kada se biljka gaji u prirodnim uslovima na niskim temperaturama (McKersie i sar., 1997). Pojačana aktivnost SOD može biti pripisana i drugim vrstama stresa koje se javljaju kada se biljka gaji u prirodnim uslovima (McKersie i sar., 1999). Povećana aktivnost Mn-SOD kod *Chlorella* povezano je sa većom tolerancijom ka niskim temperaturama (Clare i sar., 1984). Cu/Zn-SOD izoforma nestaje posle perioda niskih temperatura kod *Camellia sinensis*. U ovom slučaju predpostavlja se da igra važnu ulogu smanjenju oksidativnog stresa, da bi posle prekida dormancije tu ulogu preuzele ostale izoforme SOD (Vyas i sar., 2007). Pojačana ekspresija gena za Cu/Zn-SOD, koja se nalazi u hloroplastima, javlja se u uslovima oksidativnog stresa kod duvana (Allen, 1995). Pojačana ekspresija gena za Mn-SOD i CAT kod ozime pšenice raste tokom celog perioda hlađenja, iz nedelje u nedelju, i zadržava se tokom cele zime (Baek i Skinner, 2003). Klijanci leblebije tretirani tokom tri dana temperaturom od 4 °C pokazivali su tri puta veću koncentraciju Cu/Zn SOD od kontrolnih (Hernández-Nistal i sar., 2002). Kod sorti krompira koje su tolerantne na niske temperature primećena je veća tolerancija na superoksidni anjon, kao i veća aktivnost SOD u odnosu na genotipove koji su osetljivi na niske temperature (Seppänen i sar., 1998). Pored podataka o tome da su navedene izoforme karakteristične za stres izazvan niskim temperaturama, postoje i podaci da tretman niskim temperaturama ne dovodi do sinteze novih izoformi SOD kao kod pšenice (Scebba i sar., 1998).

Pojedini autori navode da ne postoji korelacija u aktivnosti SOD i perioda tokom kojeg su biljke bile podvrgnute niskim temperaturama, odnosno da je aktivnost SOD ista pre i posle tretmana niskim temperaturama kao što je već pomenuto kod paradajza (Walker i McKersie, 1993), pojedinih linija kukuruza (Hodges i sar., 1997) i krastavca (Shen i sar.,

1999). Kod nekih linija kukuruza i krompira koje su osjetljive na niske temperature dolazi do naglog pada aktivnosti SOD, čak u prvih nekoliko sati od primene niske temperature, da bi se na kraju tretmana vrednosti vratile na početne (Lukatkin, 2002). Pomenuti autori smatraju da SOD nema bitnu ulogu u preživljavanju kod pomenutih vrsta. Različiti rezultati i tumačenja uloge koju SOD ima u prevazilaženju oksidativnog stresa izazvanog niskim temperaturama, mogu se objasniti različitim izoformama koje su bile ispitivane od strane brojnih istraživača, različitom dužinom hladnog tretmana kojem su biljke bile podvrgnute kao i razlikama u temperaturi koja je bila primenjena (Lukatkin, 2002). Različite vrste stresa kao i intenzitet tog stresa mogu aktivirati pojedine izoforme SOD, pa tako niske temperature mogu suprimirati, pojačati ili održavati SOD aktivnost na istom nivou u zavisnosti od temperaturnog režima i vrste biljke (Kaminaka i sar., 1999).

Aktivnost katalaza smanjuje se tokom tretmana hlađenja lukovica *F. meleagris* niskim temperaturama *in vitro*. Najveću aktivnost katalaze imaju kada je tretman niskim temperaturama završen. Listovi pšenice su pokazivali pojačanu aktivnost CAT tokom prvih 7 dana niskih temperatura tokom zime da bi narednih 7 nedelja aktivnost CAT bila konstantno smanjena (Janda i sar., 2003). Pokazano je da se aktivnost katalaza naglo povećava na početku hladnog perioda i to naročito kod genotipova koji su dobro adaptirani na niske temperature kao kod kukuruza (Hodges i sar., 1997a; Hodges i sar., 1997b), krastavca (Shen i sar., 1999) i pirinča (Sarayama i Tanida, 1995; Fadzilah i sar., 1996). Posle perioda hlađenja aktivnost katalaza se vraća na početnu vrednost (Zhang i sar., 1995). Kod transgenih biljaka paradajza koje imaju smanjenu katalaznu aktivnost veoma se smanjuje rezistencija na niske temperature (Kerdnaimongkol i Woodson, 1999) što ukazuje na činjenicu da katalaze imaju veoma važnu ulogu u oksidativnom stresu izazvanom niskim temperaturama. Pojačana aktivnost katalaza posle tretmana niskim temperaturama kod lukovica *F. meleagris* može značiti da ovi enzimi imaju ulogu u popravljanju eventualnih oštećenja izazvanih niskim temperaturama, slično kao kod paradajza i pšenice (Lukatkin, 2002). Fotosintetička tkiva biljaka proizvode velike količine vodonik peroksida u svojim hloroplastima i poseduju sisteme odbrane od njegovog štetnog delovanja (Auh i Scandalios, 1997) iako se same katalaze ne nalaze u hloroplastima (Dat i sar., 2000). Smanjena aktivnost katalaza u etioliranim tkivima lukovica koje su bile na niskim temperaturama

tokom određenog perioda može biti objašnjena smanjenom fotosintezom koja indirektno utiče na aktivnost katalaza. Kada fotosinteza počne neometano da se odvija, a to je na kraju tretmana niskom temperaturom, aktivnost katalaza se naglo povećava. Slični rezultati dobijeni su na etioliranim klijancima krompira (Lukatkin 2002). Nir i sar. (1986) zaključili su da je kod grožđa dormancija pozitivno korelisana sa aktivnošću katalaza i produkcijom vodonik peroksida. Inhibitori funkcije katalaza kao što su tiourea, natrijum nitrit i hidroksilamid dovode do naglog prekida dormancije kod semena salate (Hendricks i Taylorson, 1975) i krtola krompira (Beukema i van der Zaag, 1990). Ovi podaci slažu se sa smanjenjem aktivnosti katalaza posle tretmana niskom temperaturom kada je dormancija prekinuta niskim temperaturama. Vodonik peroksid, kao jedan od mogućih kandidata za funkciju sekundarnog glasnika za prekid procesa dormancije, mora biti održavan na konstantnom nivou tokom delovanja niske temperature. Katalaze čija aktivnost raste tokom perioda niskih temperatura održavaju koncentraciju vodonik peroksida razlažući ga do vode i kiseonika. Konstantan rast aktivnosti katalaza tokom perioda niskih temperatura može se objasniti njihovim slabim afinitetom za vodonik peroksid (Mizuno i sar., 1998), tj. potrebom da vodonik peroksid dostigne određenu koncentraciju koja bi bila dovoljna za aktiviranje katalaza, što se dešava njegovom akumulacijom tokom perioda delovanja niskih temperatura.

Suprotno katalazama, jedan od enzima iz grupe peroksidaza (askorbat peroksidaza) je inaktiviran velikom količinom vodonik peroksida. Na taj način se može objasniti zašto su peroksidaze najaktivnije na početku delovanja niske temperature, a pokazuju najmanju aktivnost kada se dormancija prekine odnosno aktivne su kada katalaze nisu i obrnuto. Ukoliko je katalazna aktivnost inhibirana ili smanjena, vodonik peroksid oksiduje NADPH i na taj način dovodi do povećanja koncentracije NADP⁺ (Hendricks i Taylorson, 1975). Povećana katalazna aktivnost posle perioda niskih temperatura sprečava da se NADPH oksiduje neutrošenim vodonik peroksidom, jer je redukovana forma ovog jedinjenja neophodna za odvijanje Kalvinovog ciklusa koji se posle prekida dormancije intenzivno odigrava. Pojačana akumulacija vodonik peroksida može se povezati i sa povećanom aktivnošću SOD koja je kod lukovica *F. meleagris* najintenzivnija posle 8 nedelja

provedenih na 4 °C. Kako aktivnost SOD raste tako raste i katalazna aktivnost koja mora eliminisati nakupljeni vodonik peroksid.

Aktivnost GR je najveća kod lukovica gajenih na konstantnih 24 °C u uslovima *in vitro*. U prirodnim uslovima GR pokazuje najnižu aktivnost u lukovicama *F. meleagris* tokom 5 meseci zimskog perioda. Generalno GR pokazuje male fluktuacije u vrednostima u zavisnosti od tretmana kojim su lukovice bile podvrgnute. Ovaj enzim učestvuje u produkciji NADP⁺ koji je neophodan kao akceptor elektrona sa fotosistema I. Smatra se da na taj način GR indirektno utiče na fotosintezu koja je najintenzivnija kada biljka raste na optimalnoj temperaturi (Steffen i Palta, 1987). Na kraju tretmana niskom temperaturom koja prekida dormanciju, dolazi do blagog porasta aktivnosti GR kod lukovica. Fontaine i sar. (1994) primetili su da posle prekida dormancije kod ovasa dolazi do povećane proizvodnje glutaciona koji je proizvod aktivnosti GR. Ekspresija gena za GR kod pšenice je slabo pojačana samo tokom prve nedelje niskih temperatura da bi posle toga opala. (Baek i Skinner, 2003). Glutacion kao komponenta neenzimatskog sistema antioksidativne zaštite ćelije, može biti potreban u većoj količini posle završene dormancije radi saniranja eventualne štete nastale oksidativnim stresom. Metabolički procesi koji se intenzivno aktiviraju posle dormancije odnosno kada se lukovica priprema za klijanje dovode do formiranja velikih količina ROS koje moraju biti eliminisane, u ovom slučaju glutacionom. Kada je aktivnost katalaza pojačana, dolazi do brze eliminacije vodonik peroksida koji je početni supstrat za askorbat glutacion ciklus kao i za glutacion peroksidazni ciklus. U normalnim uslovima ova dva ciklusa služe za eliminaciju vodonik peroksida iz biljnih ćelija, ali se smatra da su katalaze glavni enzimi koji razlažu vodonik peroksid u stresnim situacijama (Mizuno i sar., 1998). GR je jedan od enzima koji učestvuje u oba ciklusa i njegova aktivnost zavisi od koncentracije vodonik peroksida, pa se na taj način može objasniti zašto je aktivnost GR mala kada je aktivnost katalaza povećana i obrnuto.

Aktivnost ukupnih peroksidaza kod lukovica *F. meleagris* je najveća 3 dana posle početka delovanja niskih temperatura *in vitro*. Slabe promene aktivnosti peroksidaza uočene su u krtolama krompira koje su bile dormantne (Rojas-Beltran i sar., 2000).

U prirodnim uslovima aktivnost POX je najveća tokom novembra meseca tj. na početku zimskog perioda godine. Kao što je pomenuto ROS mogu imati funkciju

sekundarnih glasnika za razne metaboličke procese u biljnoj ćeliji (Remacle i sar., 1995). Najjači kandidat za sekundarnog glasnika bio bi vodonik peroksid koji može veoma lako proći kroz ćelijske mebrane i kao takav biti signal za aktivaciju ili eventualno prekidanje metaboličkih puteva (Rojas-Beltran i sar., 2000). Na početku delovanja niskih temperatura vodonik peroksid bi se mogao formirati u povećanoj količini kao odgovor biljke na stres izazvan tim temperaturama. Prvi enzimi koji bi se u tom slučaju aktivirali bile bi peroksidaze, da bi tokom daljeg hlađenja ulogu ukljanjanja suvišnog vodonik peroksida preuzele katalaze čija aktivnost raste tokom hlađenja i dostiže maksimum aktivnosti sedam dana posle završenog tretmana hlađenja. Peroksidaze imaju najmanju aktivnost baš u to vreme kada je katalazna aktivnost najveća, odnosno sedam dana posle iznošenja biljaka na 24 °C. S obzirom na to da su u konkurenciji za isti supstrat, tj. vodonik peroksid, kao i da imaju različit afinitet za koncentraciju vodonik peroksida, katalaze i peroksidaze se aktiviraju u različito vreme. Aktivnost peroksidaza je generalno manja u odnosu na katalaze što govori u prilog tome da glavnu ulogu u prekidu dormancije i pripremi lukovica za klijanje imaju katalaze što je slično rezultatima dobijenim na krtolama krompira (Rojas-Beltran i sar., 2000). Povećana akumulacija vodonik peroksida tokom tretmana lukovica niskim temperaturama može dostići određenu koncentraciju koja je potrebna da se ćelije aktiviraju što vodi ka prekidu dormancije. Ova hipoteza potvrđena je kod vrsta kao što je krompir (Rojas-Beltran i sar., 2000), soja (Puntaluro i sar., 1988) i ovas (Cakmak i sar., 1993) koje su tretirane određenim koncentracijama vodonik peroksida i koje su kao posledicu imale kraći period dormancije od kontrolnih.

5.4. Biohemijski aspekti indukcije morfogeneze *in vitro* *F. meleagris*

Analiza antioksidativnih enzima i esteraza kao i sadržaj AGP određivani su u segmentima lukovice i bazalnim delovima listova *F. meleagris* tokom prve 4 nedelje gajenja na induktivnim hranljivim podlogama. Tokom tog perioda, što se iz prethodnih rezultata vidi, dolazi do indukcije morfogeneze *in vitro* koja podrazumeva istovremeno formiranje lukovica (organogeneza) na i/ili somatskih embriona (somatska embriogeneza) u zavisnosti od korišćenog eksplantata.

5.4.1. Aktivnost antioksidativnih enzima i esteraza tokom indukcije morfogeneze *in vitro*

Analiza aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid dismutaze, katalaza i peroksidaza) i esteraza određivana je za segmente lukovica *F. meleagris* kod kojih je indukovana morfogeneza na hranljivoj podlozi koja je sadržala TDZ, odnosno 2,4-D i KIN u koncentracijama 1 mg/l svaki. Pre indukcije morfogeneze *in vitro* biljke gajene su tokom mesec dana na tri različita pretretmana.

Tokom indukcije somatske embriogeneze *F. meleagris* u kulturi segmenta lukovica detektovano je 6 izoformi esteraza, u kiselom i u baznom regionu, koje imaju najveći afinitet za 1-naftil acetat kao supstrat. Kod slatkog krompira veći broj izoformi esteraza može se detektovati u embriogenom tkivu u odnosu na neembriogeno (Alves i sar., 1994). Isti autori naglašavaju da ne postoji razlika u broju izoformi esteraza i peroksidaza kod embriogenog kalusnog tkiva i globularnih embriona. Dodeman i Ducreux (1996) naglašavaju da ne postoje izoforme specifične za embriogenezu, a to baziraju na analizi koja je urađena na deset različitih faza razvoja somatskih embriona šargarepe i 7 ispitivanih enzima. Međutim, broj radova koji govore u prilog specifičnosti pojedinih izoformi koje se javljaju u ranim stadijumima somatske embriogeneze je daleko veći.

Veći broj izoformi esteraza tokom somatske embriogeneze *F. meleagris*, odnosno 4 izoforme, uočen je u kiselom pH regionu koji se kreće u opsegu pI vrednosti od 3,5 do 6,5. Kod suspenzije embriogenih ćelija *Dactylis glomerata* stare 7 dana, takođe je detektovan veliki broj esteraza u kiselom pH regionu (kisele esteraze) sa manjim brojem izoformi koje su vidljive u baznom pH regionu (Tchorbadjieva i Odjakova, 2001). Vrednost pI ovih kiselih esteraza kretale su se od 3,8 do 5,8 što je u slučaju najkiselije izoforme (pI 3,8) slično najkiselijoj izoformi koja se javlja tokom indukcije morfogeneze *F. meleagris in vitro* (pI 3.5). U slučaju košutice pojedine izoforme javljaju se uvek u pH regionu od 6.55. Najjače izražena izoforma označena je brojem 6 i ima pI vrednost oko 5.20. Izoforme esteraza mogu biti i specifične za genotip kao što je slučaj sa različitim ćelijskim linijama *Dactylis glomerata* (Tchorbadjieva i Odjakova, 2001). Esteraze koje su specifične za određene početne stadijume somatske embriogeneze mogu se koristiti kao rani markeri i

mного su interesantnije za istraživanje od pojedinih nespecifičnih izoformi. Jedna od takvih izoformi je kisela izoforma sa pI vrednošću od 3.8 koja se javlja kod *Dactylis glomerata* (Tchorbadjieva i Odjakova, 2001), dve kisele izoforme kod pamuka (Hilaire i sar., 2007) i nekoliko kiselih izoformi slatkog krompira (Alves i sar., 1994).

Izoforme 1 i 2 nisu detektovane u kulturama košutice 7 dana nakon indukcije morfogeneze *in vitro*, gajenim na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN, kao ni 28. dana na hranljivoj podlozi sa TDZ, pri standardnim uslovima gajenja *in vitro*. Ove izoforme se specifično javljaju u kasnijim fazama indukcije i to 28. dana kod kultura gajenih na podlozi sa 2,4-D i KIN, odnosno 21. dana na podlozi sa TDZ. Osim pomenute dve izoforme koje imaju smanjenu aktivnost ili odsustvuju u početnim stadijumima indukcije morfogeneze *F. meleagris in vitro*, nema mnogo razlika u izoformama esteraza u različitim stadijumima somatske embriogeneze. Aktivnost esteraza je manja na samom početku (7. dan) i raste kako proces morfogeneze traje, što može ukazivati na aktivnu ulogu esteraza tokom početnih faza indukcije morfogeneze *in vitro*. Izoforme koje se menjaju, tj. javljaju se ili se gube tokom vremena mogu biti ključne za početak indukcije morfogeneze. U slučaju somatske embriogeneze *F. meleagris* izoforme označene brojevima 2, 3, 4 i 5 javljaju se samo tokom procesa morfogeneze. Kisela izoforma pI vrednosti 3,8 koja se javlja u embriogenom tkivu *Dactylis glomerata* ima molekulsku masu od 36 kDa i vezana je za ćelijski zid veoma slabom vezom što omogućava slobodno delovanje enzima u vanćelijskom prostoru kao i u medijumu (Tchorbadjieva i Odjakova, 2001). Istraživanja Bordenave i Goldberg-a (1994) na zelenom pasulju ukazuju na mogućnost da se radi o kiseloj pektin metil esterazi koja je takođe slabo vezana za ćelijski zid i aktivna je u okolnoj hranljivoj podlozi. Tri izoforme koje su analizirane imaju pI vrednosti između 5,1 i 5,6. Analize izoformi tokom embriogeneze u ovom istraživanju nisu rađene pa se ne može reći da li ima promena u njihovom broju. Slična zapažanja o eventualnom učešću pektin metil esteraze navode Mareck i sar. (1995) za *Linum usitatissimum* i Gaffe i sar. (1997) za paradajz. Razviće bilnog embriona zavisi od kontakta i komunikacije između ćelija kao i od reorganizacije komponenti ćelijskog zida u cilju deoba (Varner i Lin, 1989). Srednja pektinska lamela služi kao kontakt među ćelijama, pa bi eventualno razlaganje pektina moglo imati uticaja na početne faze u embrionalnom razviću (Van Engelen i De Vries,

1993). Razlaganje polisaharida ćelijskog zida koje bi služilo kao okidač za proces somatske embriogeneze može se pripisati esterazama. Ovu hipotezu potvrđuju i Mihaljević i sar (2011) koji su primetili pojačanu aktivnost esteraza tokom somatske embriogeneze bundeve. Tačno definisana uloga esteraza koje su specifične za somatsku embriogenezu ne može se navesti, kao što se ne može reći da one imaju posebnu ulogu u odnosu na druge faktore. Esteraze sa većim ili manjim brojem izoformi učestvuju u procesu somatske embriogeneze, i kao takve se mogu nazvati markerima, ali verovatno deluju zajedno sa drugim faktorima i na taj način potpomažu i olakšavaju sam proces.

Aktivnost peroksidaza bila je najveća u segmentima lukovica neposredno posle izolacije bez obzira na pretretman i hranljivu podlogu koji su primenjeni. Tokom indukcije morfogeneze *F. meleagris in vitro* uočeno je 11 izoformi peroksidaza koje su predominantno detektovane u baznom pH opsegu. Izoforme 1, 6, 8 nisu detektovane u segmentima lukovica neposredno posle izolacije. Izoforma 2 je jače izražena u kontrolnim segmentima lukovica nego u segmentima lukovica kod kojih je počeo proces morfogeneze na obe ispitivane induktivne hranjive podloge bez obzira na pretretman. U odnosu na kontrolu, broj izoformi se povećava tokom prve tri nedelje od indukcije morfogeneze što govori o mogućem učešću peroksidaza u početnim fazama procesa. Mnogi stresni faktori mogu uticati na broj izoformi peroksidaza klase III koje su prisutne kod biljaka (Hiraga i sar., 2001). Peroksidaze mogu uticati na nivo endogenih auksina i na taj način indirektno uticati na proces somatske embriogeneze (Park i sar., 2007). Peroksidaze mogu inhibirati aktivnost enzima IAA oksidaze koji katalizuje oksidaciju, a samim tim i inaktivaciju IAA (Potters i sar., 2009). Pojedine izoforme peroksidaza javljaju se samo u embriogenom tkivu lucerke u odnosu na neembriogeno (Hrubcová i sar., 1994).

Detektovano je 5 izoformi SOD i to dve Cu/Zn i tri Fe-SOD. Svih 5 izoformi tokom morfogeneze javljaju se samo kod lukovica koje su bile konstantno gajene na 24 °C. Njihova relativna aktivnost razlikuje se u zavisnosti od regulatora rastenja primenjenog za indukciju morfogeneze. Lukovice kod kojih nije indukovana morfogeneza imale su najmanju relativnu aktivnost SOD. Smanjen broj izoformi (4 izoforme) javlja se još kod lukovica koje su bile na pretretmanu niskom temperaturom i to 28. dana od indukcije na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN i posle 21. i 28. dana od indukcije na hranljivoj podlozi sa

TDZ. Najveća relativna aktivnost SOD kod lukovica koje su bile na niskoj temperaturi razlikuje se u zavisnosti od hranljive podloge koja je korišćena za indukciju. Moguće je da je tokom delovanja te temperature aktivan manji broj izoformi da bi se tokom indukcije morfogeneze aktiviralo svih 5 izoformi. Po 4 izoforme (2 Cu/Zn i 2 Fe-SOD) javljaju se kod segmenata lukovice gajenih na hranljivoj podlozi sa TDZ i to 14. i 28. dana od početka indukcije morfogeneze ukoliko su biljke gajene na hranljivoj podlozi sa 4,5 % saharoze. Najveća relativna aktivnost SOD kod pomenutog pretretmana bila je posle 7 dana od početka indukcije morfogeneze na obe ispitivane hranljive podloge. Dve izoforme Cu/Zn-SOD aktivne su u svim ispitivanim uzorcima. Jedna od izoformi Fe-SOD gubi se u pojedinim fazama morfogeneze. Slično ovim rezultatima Fe-SOD se tokom somatske embriogeneze kestena sukcesivno pojavljuje u pojedinim fazama (Bagnoli i sar., 1998). Fe-SOD bi u tom slučaju bila izoforma koja se aktivira u uslovima stresa, da bi hloroplasti bili adekvatno zaštićeni od štetnog delovanja ROS koji se ubrzano nagomilavaju aktivnošću elektron transportnog lanca. Ukupna aktivnost SOD kod lukovica košutice gajenih na standardnoj temperaturi kao i kod lukovica gajenih na hranljivoj podlozi sa 4,5 % saharoze bila je najveća posle 7 dana i to na obe inaktivne hranljive podloge. Posle pretretmana niskom temperaturom visoke aktivnosti SOD detektovane su 7. odnosno 14. dana. Katalaze su takođe imale najveću aktivnost 7. dana od indukcije morfogeneze kod lukovica gajenih na standardnoj temperaturi kao i kod lukovica koje su bile na niskoj temperaturi. Posle gajenja lukovica na podlozi sa 4,5 % saharoze aktivnost katalaza je najveća 14. dana gajenja na podlozi sa 2,4-D i KIN, odnosno posle 21. dana gajenja na podlozi sa TDZ.

Pojačana aktivnost ispitivanih antioksidativnih enzima, tokom prvih nedelja od početka indukcije morfogeneze *in vitro* može se dovesti u vezu sa regulatorima rastjenja kojima su izloženi segmenti lukovica u cilju indukcije morfogeneze, kao i sa stresom izazvanim sečenjem lukovica. Tokom oksidativnog stresa ćelija se može dediferencirati i krenuti ka procesu somatske embriogeneze (Pasternak i sar., 2002). Sintetski regulatori rastjenja sami po sebi mogu dovesti do oksidativnog stresa koji je sličan oksidativnom stresu izazvanim drugim stresnim faktorima (Grossmann, 2000). Za rane stadijume somatske embriogeneze karakteristična je indukcija ekspresije mnogih gena vezanih za odgovor biljke na stresne stimuluse (Davletova, 2001), što govori u prilog hipoteze Dudits i

sar. (1995) da je somatska embriogeneza odgovor na stresne uslove kojima su izložene biljke *in vitro*. Smatra se da oksidativni stres, odnosno povećana produkcija ROS, dovodi do indukcije somatske embriogeneze tako što povećava nivo endogenih auksina i ubrzava proces dediferencijacije (Pasternak i sar., 2002; Correa-Aragunde i sar., 2006). Kairong i sar. (2002) ustanovili su korelaciju između povećane koncentracije vodonik peroksida i indukcije somatske embriogeneze. Njihovi rezultati pokazuju da se aktivnost SOD povećava u prvim danima od indukcije, što se dešava i kod indukcije morfogeneze *in vitro* *F. meleagris* gde je aktivnost SOD najveća posle 7 dana gajenja na svim tretmanima. Povećana aktivnost SOD na početku procesa somatske embriogeneze dovodi do povećanja koncentracije vodonik peroksida. Samim tim dolazi do promena u aktivnosti peroksidaza i katalaza koje su u kompeticiji za isti supstrat, tj. vodonik peroksid. Povećanje aktivnosti katalaza prati povećanu aktivnost SOD, tako da je aktivnost katalaza najveća 7. odnosno 14. dana od početka indukcije. Aktivnost peroksidaza je najveća u kontrolnim lukovicama gde je koncentracija vodonik peroksida najmanja jer one imaju veći afinitet za vodonik peroksid nego katalaze (Passardi i sar., 2005). Vodonik peroksid koji se nagomilava pod uticajem brojnih stresnih faktora i aktivnosti SOD, a deluje kao signalni molekul koji može aktivirati određene gene i na taj način uticati na sintezu proteina koji su uključeni u inicijaciju somatske embriogeneze (Apel i Hirt, 2004). Vranová i sar. (2002) navode da onda kada su umnožavanje i rastenje ćelija pod negativnom kontrolom ROS, vodonik peroksid stimuliše somatsku embriogenezu. Ganesan i Jayabalan (2004) potvrđuju hipotezu da su oksidativni stres i somatska embriogeneza povezani. Oni su dodavali hemoglobin u hranljivu podlogu kako bi povećali koncentraciju kiseonika i indukovali oksidativni stres u kulturi ćelija pamuka gde je primećeno povećanje koncentracije SOD i peroksidaza tokom prvih faza somatske embriogeneze. Postoje dokazi da vodonik peroksid aktivira specifičnu protein kinazu kod *Arabidopsis*-a koja pokreće fosforilaciju MAPK („mitogen-activated protein kinase“) i tako se aktiviraju geni specifični za odbranu biljke od stresnih faktora (Kovtun i sar., 2000).

Antioksidativni enzimi imaju važnu ulogu u procesu organogeneze biljaka što je potvrđeno analizom POX, CAT, SOD i esteraza tokom morfogeneze šafrana (Sharifi i Ebrahimzadeh, 2010). Izoforme esteraza i peroksidaza smatraju se markerima morfogeneze

in vitro, pre bilo kakvih uočljivih promena morfoloških karakteristika (Coppens i Dewitte, 1990; Rao i sar., 1990; Bapat i sar., 1992). Pomenuti enzimi pokazuju obično pojačanu aktivnost tokom zigotske i somatske embriogeneze (Egertsdotter, 1998; Hrubcová i sar., 1994; Kormutak i sar., 2003). Pored esteraza i peroksidaza koje su pomenute kao potencijalni markeri somatske embriogeneze, Bagnoli i sar. (1998) ukazuju na to da superoksid dismutaze i katalaze takođe mogu biti pogodne za praćenje stadijuma somatske i zigotske embriogeneze kod kestena.

Antioksidativni enzimi i esteraze koji su uključeni u proces morfogeneze *F. meleagris in vitro* ne pokazuju značajne promene u zavisnosti od primenjenih regulatora rastenja i pretretmana što ukazuje na to da je proces morfogeneze strogo definisan bez obzira kojim regulatorima rastenja je izazvan. Male razlike u aktivnosti pomenutih enzima koje se uočavaju između lukovica koje su različito pretretirane i gajene na podlogama sa različitim regulatorima rastenja mogu se pripisati različitom nivou stresa koji ovi različiti faktori mogu izazvati.

5.4.2. Sadržaj arabinogalaktanskih proteina tokom indukcije morfogeneze *in vitro*

Do sada nema objavljenih podataka o ulozi arabinogalaktanskih proteina u indukciji morfogeneze *in vitro* vrsta roda *Fritillaria*. U toku procesa indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi segmenta lukovica i bazalnih delova lista *F. meleagris* uočava se povećanje koncentracije AGP. Povećanje koncentracije AGP na samom početku procesa somatske embriogeneze primećeno je i kod šargarepe (Thompson i Knox, 1998) kao i kod cikorije (Chapman i sar., 2000). AGP iz hranljive podloge mogu stimulisati formiranje somatskih embriona (Egertsdotter i Van Arnold, 1995; Tchorbadjieva, 2005; Zagorchev i sar., 2008). Koncentracija AGP može se menjati tokom različitih faza somatske embriogeneze kao što je pokazano kod šargarepe gde je najveća koncentracija AGP detektovana u proembriogenoj masi i ranim stadijumima razvića somatskog embriona (Stacey i sar., 1990). Smatra se da je uloga AGP u početnim stadijumima razvića somatskog embriona (globularni i srcasti stadijum) veoma važna za uspostavljanje bipolarnog razvića somatskog embriona (Tang i sar., 2006).

Koncentracije AGP kod eksplantata košutice na hranljivoj podlozi bez regulatora rasteća koji su predhodno gajeni na 4 °C bile su niže u odnosu na kulture koje su konstantno gajene na standardnoj temperaturi. Baze lista su mnogo podložnije uticaju niskih temperatura od lukovica koje delovanjem tih temperatura uobičajeno prevazilaze dormanciju, pa se i fiziološki procesi kod njih dosta razlikuju u zavisnosti od temperature na kojoj se gaje.

U kulturi bazalnih segmenta listova već 7. dana dolazi do povećanja koncentracije AGP sa maksimumom posle 21. dana gajenja. U kulturi segmenta lukovica dolazi do prvobitnog smanjenja koncentracije AGP do 14. dana, a zatim značajnog povećanja 28. dana u kulturi.

Najviše koncentracije AGP u kasnijim fazama razvića somatskih embriona mogu se dovesti u vezu sa njihovom ulogom u razviću kotiledona i vaskularnih elemenata, kao što je pokazano kod *Arabidopsis*-a (Zhong sar., 2011). Rani kotiledonarni stadijum razvića somatskih embriona *F. meleagris* uočava se 14. dana od početka indukcije, da bi se kotiledoni potpuno razvili 28. dana u kulturi bazalnih segmenta lista. Toonen i sar. (1997) pretpostavljaju da se tokom somatske embriogeneze AGP sintetišu u posebnim ćelijama koje proizvode određeni tip AGP neophodan u procesu somatske embriogeneze. Kako proces odmiče i broj tih ćelija se uvećava, proizvodi se više AGP. Ekspresija AGP može biti različita u ćelijama osnove lista i segmenta lukovica u zavisnosti od toga kako reaguju na stres izazvan bilo različitim regulatorim rasteća bilo povredom tkiva prilikom isecanja eksplantata. Suspenzija ćelija kokosa pokazivala je različit sadržaj AGP u zavisnosti od fenotipa biljke (Motose i sar., 2004). Više koncentracije AGP uočavaju se u kulturama baze lista gajenim na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN nego u onim koje su gajene u prisustvu TDZ, što se može dovesti u vezu sa velikim prosečnim brojem somatskih embriona koji se formiraju na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN. Intenzivnije deobe ćelija u kasnijim fazama somatske embriogeneze dovodi do veće koncentracije AGP jer su oni uključeni u proces sinteze ćelijskog zida i promenu orijentacije celuloznih mikrofibrila kao što je dokazano kod *Arabidopsis*-a i eukaliptusa (Macmillan i sar., 2010). Baze lista i same rastu i izdužuju se u isto vreme sa formiranjem somatskih embriona tako da se koncentracija AGP povećava i usled umnožavanja i izduživanja ćelija baze lista. Povećana koncentracija AGP primećena

je i ćelijskoj suspenziji brazilskog bora u kojoj su se ćelije intenzivno delile i rasle (Maurer i sar., 2010). Isti autori navode da se AGP mogu dovesti u vezu sa programiranom ćelijskom smrću odnosno da AGP koji su precipitirani Yariv reagensom, i samim tim im je smanjena koncentracija u okolnoj hranljivoj podlozi, posredno dovode do smrti ćelije.

Tokom procesa indukcije somatske embriogeneze detektovano je nekoliko tipova AGP specifičnih za pojedine stadijume razvića somatskih embriona (Kreuger i van Holst, 1995; Toonen i sar., 1997). Kreuger i Van Holst (1993) su pokazali da se različiti tipovi AGP javljaju tokom različitih faza somatske embriogeneze šargarepe. Različiti tipovi AGP mogu biti dokazani imunolokalizacijom pojedinih epitopa pomoću monoklonalnih antitela ili metodom ukrštene elektroforeze na agaroznom gelu (Ellis i sar., 2010). Ukrštenom elektroforezom pokazan je profil AGP u lukovicama i bazama listova *F. meleagris* kod kojih je indukovana proces morfogeneze *in vitro*. AGP detektovani u gelu imali su različite Rf vrednosti i samo jedan precipitacioni maksimum kao što je slučaj i kod akacije (Qi i sar., 1991). Razlike u Rf vrednostima dobijenim ukrštenom elektroforezom zavise od razlika u naelektrisanju odnosno veličini izolovanih AGP i specifični su za vrstu biljke (Kreuger i sar., 1995). Pojava dva maksimuma je karakteristična za visoko embriogene kulture šargarepe (Kreuger i van Holst, 1993) i irisa (Jevremović, 2007).

Iz ovih podataka može se zaključiti da AGP imaju značajnu ulogu tokom procesa morfogeneze košutice *in vitro*. Koncentracija AGP u tkivu se menja u zavisnosti od hranljive podloge, tipa eksplantata tokom procesa indukcije morfogeneze *in vitro*. Ovo su prvi rezultati o potencijalnoj ulozi AGP tokom različitih faza morfogeneze košutice *in vitro*.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Uspešno je indukovana *in vitro* morfogeneza košutice, *F. meleagris* u kulturi zrelih zigotskih embriona, kao i kulturi segmenata lukovica i bazalnih delova listova lukovica formiranih *in vitro*.
2. Regeneracija biljaka u kulturi zrelih zigotskih embriona postignuta je procesom somatske embriogeneze i organogeneze na hranljivoj podlozi bez regulatora rastjenja ili hranljivoj podlozi sa TDZ (1 mg/l).
3. U kulturi segmenata lukovica košutice formiranih *in vitro* indukovana je somatska embriogeneza i/ili organogeneza na hranljivoj podlozi bez regulatora rastjenja, na hranljivim podlogama sa 2,4-D (0-10 mg/l) ili sa TDZ (0-2 mg/l), prilikom gajenja na svetlosti, kao i na hranljivim podlogama sa 0-1 mg/l 2,4-D ili 0-2 mg /l TDZ prilikom gajenja segmenata lukovica u mraku. Indukcija lukovica je bila uspešnija na hranljivim podlogama kojima je dodat TDZ kao regulator rastjenja.
4. U kulturi bazalnih segmenata lista lukovica košutice formiranih *in vitro* uspešno je indikovana somatska embriogeneza na hranljivim podlogama sa 0-10 mg/l 2,4-D, KIN ili 2,4-D i KIN.
5. Anatomska istraživanja indukcije morfogeneze *in vitro* u kulturi bazalnih segmenata lista košutice su pokazala da je somatska embriogeneza direktna, a da su somatski embrioni višćelijskog porekla i formiraju se od meristemskih centara poreklom od epidermalnih i subepidermalnih ćelija eksplantata.
6. Dormancija *in vitro* formiranih lukovica košutice je uspešno prevaziđena. Poboľšano je umnožavanje i rastjenje lukovica gajenjem na nižim temperaturama (4

i 15 °C). Prethodno gajenje *in vitro* formiranih lukovica (najmanje 4 nedelje) na niskoj temperaturi (4 °C) pozitivno utiče i na aklimatizaciju biljaka. Povećanje koncentracije saharoze u hranljivoj podlozi (4,5%) podstiče rastenje lukovica košutice gajenih pri standardnim uslovima, kao i onih gajenih na 4 °C.

7. U lukovicama gajenim *in vitro* na niskoj temperaturi (4 °C) dolazi do promena u sadržaju šećera (saharoze, glukoze i fruktoze), fotosintetičkih pigmenata i poliola.
8. Predtretman lukovica rastvorom GA₃ (1-3 mg/l) inhibira umnožavanje i rastenje lukovica košutice tokom perioda delovanja niskih temperatura, ali stimuliše umnožavanje lukovica posle izlaganja niskim temperaturama. Pored toga, klijanje lukovica je bolje posle pretretmana rastvorom GA₃, ali dalje rastenje lukovica ne može se postići bez određenog perioda gajenja lukovica na niskoj temperaturi.
9. Enzimi antioksidativnog sistema košutice (superoksid dizmutaza, katalaza, glutation reduktaze i peroksidaza) aktivno učestvuju u procesima prekidanja dormancije *in vitro* formiranih lukovica, usled delovanja niskih temperatura, kao i aklimatizacije na *ex vitro* uslove.
10. Enzimi antioksidativnog sistema košutice (superoksid dismutaze, katalaze i peroksidaze) aktivno učestvuju u odgovoru na stres tokom indukcije morfogeneze *in vitro* na hranljivim podlogama sa 2,4-D i TDZ. Aktivnost enzima zavisi i od regulatora rasteња u hranljivoj podlozi kao i od pretretmana kojima je biljka bila izložena. Superoksid dismutaze i katalaze pokazuju najveću aktivnost već posle 7 dana gajenja segmenata lukovica na hranljivim podlogama sa regulatorima rasteња dok je aktivnost peroksidaza najveća u segmentima lukovica neposredno posle izolacije.
11. Arabinogalaktanski proteini imaju značajnu ulogu tokom indukcije morfogeneze košutice *in vitro* u kulturi bazalnih delova lista i segmenata lukovica na hranljivim

podlogama sa 2,4-D i KIN ili TDZ. Koncentracija AGP se povećava već posle 7 dana gajenja bazalnih segmenata lista na hranljivim podlogama sa regulatorima rasteња dok se u kulturi segmenata lukovica koncentracija AGP u tkivu značajno povećava posle 3 nedelje gajenja. Koncentracija AGP je veća u bazalnim segmentima lista gajenim na hranljivoj podlozi sa 2,4-D i KIN nego na hranljivoj podlozi sa TDZ. U indukciji morfogeneze košutice *in vitro* učestvuje jedan tip AGP.

12. Utvrđeno je, po prvi put, prisustvo i aktivnost 6 izoformi esteraza tokom indukcije morfogeneze košutice *in vitro* u kulturi segmenata lukovica. Aktivnost pojedinih izoformi esteraza tokom prve 4 nedelje indukcije se menja i zavisi od pretretmana na kojima su biljke gajene pre izolacije kao i od regulatora rasteња u hranljivoj podlozi.

LITERATURA

- Aguettaz P, Paffen A, Delavalle I, Van Der Linde P, De Klerk GJ** (1990) The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated *in vitro* I. The effects of culture condition. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 22, 167-172
- Alexander L, Grierson D** (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climatcteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 53, 2039-2055
- Allen RD** (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology* 107, 1049-1054
- Alp Ş Arslan N, Koyuncu M** (2009) Established forms of *Fritillaria imperialis* L. – A naturally growing species in Turkey. *Pakistan Journal of Botany* 41 (4), 1573-1576
- Alves JMC, Sihachakr D, Allot M, Tizoutine S, Mussio I, Servaes A, Ducreux G** (1994) Isozyme modifications and plant regeneration through somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam). *Plant Cell Reports* 13, 437-441
- Abassi NA, Kushad MM** (1998) Active oxygen-scavenfing enzymes activities in developing apple flowers and fruits. *Scientia Horticulturae* 74, 183-194
- Aebi H** (1984) Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105, 121-126
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Expeimental Botany* 53, 1331-1341
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399
- Asada K, Kanematsu S, Okaka S, Hayakawa T** (1980) Chemical and biochemical aspects of superoxide and superoxide dismutase. Bannister JV and Hill AO (eds.) Elsevier/North, New York, 136
- Auh CK, Scandalios JG** (1997) Spatial and temporal responses of the maize catalases to low temperature. *Physiologia Plantarum* 101, 149-156
- Aung LH, De Hertogh AA** (1979) Temperature regulation of growth and endogenous abscisic acid-like content of *Tulipa gesneriana* L. *Plant Physiology* 63, 1111-1116
- Baek KH, Skinner DZ** (2003) Alternation of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near isogenic wheat lines. *Plant Science* 165, 1221-1227

- Bagnoli F, Capuana M, Racchi M** (1998) Developmental changes of catalase and superoxide dismutase isoenzymes in zygotic and somatic embryos of horse chesnut. *Australian Journal of Plant Physiology* 25, 909-913
- Bailly C, Leymarie J, Lehner A, Rousseau S, Come D, Corbineau F** (2004) Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *Journal of Experimental Botany* 55, 475-483
- Bakhshaie M, Badalar M, Mirmasoumi M, Khalighi** (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss., an endangered species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 102, 229-235
- Balen B, Krsnik-Rasol M, Simeon-Rudolf M** (2003) Isoenzymes of peroxidase and esterase related to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture. *Journal of Plant Physiology* 160, 1401-1406
- Baldwin T C, van-Hengel A J, Roberts K** (1993): A novel hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein secreted by suspension-cultured cells of *Daucus carota*. Purification and partial characterisation. *Plant Physiology*, 103: 115-123
- Banasik I, Rudnicki RM, Saniewski M** (1980) The physiology of hyacinth bulbs (*Hyacinthus orientalis* L.). XIII. The distribution of amylase and acid phosphatase activities and starch grain in hyacinth bulbs. *Acta Physiologiae plantarum* 2, 145-156
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G** (1987) Aspects of the structure, function and application of superoxide dismutase. *Critical Review of Biochemistry* 22, 111-118
- Bapat SA, Rawal SK, Mascarenhas AF** (1992) Isozyme profiles during ontogeny of somatic embryos in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* 82, 235-242
- Barcizewski J, Siboska GE, Pedersen BO, Clark BFC, Rattan SIS** (1997) Mechanism for the *in vivo* formation of N-6-furfuryladenine, kinetin, as a secondary oxidative damage product of DNA. *FEBS Letters* 414, 457-460
- Beauchamp C i Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44, 276-287
- Benkelblia N, Onodera S, Shiomi N** (2003) Effects of temperature and storage time on fructosyltransferase activities (1-FFT and 6G-FFT) in onion bulb tissue. *Acta Agriculturae Scandinavica* 53, 211-214

- Benkeblia N.** (2008). The physiology of dormancy of onion bulb *Allium cepa*. In: Hamantaranjan, A. (eds.). Advances in Plant Physiology, An International Treatise Series. Vol. 10, Scientific Publisher, pp. 233-244.
- Beukema HP, van der Zaag DE** (1990) Introduction to potato production. Wageningen, Wageningen, Pudoc, 208
- Beyer WF, Fridowich I** (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Annals of Biochemistry* 161, 559-556
- Bewley** (1997) Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9, 1055-1066
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV** (2003) Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Stress: a Review. *Annals of Botany* 91, 179-194
- Bradford MM** (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254
- Bordenave M, Goldberg R** (1994) Immobilized and free apoplastic pectin methylesterases from mung bean hypocotyl. *Plant Physiology* 106, 1151-1156
- Bordenave M, Goldberg R, Heut JC, Pernollet JC** (1995) A novel protein from mung bean hypocotyl cell walls with acetyl esterase activity. *Phytochemistry* 38, 315-319
- Bowler C, Van Montagu M, Inzé D** (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 83-116
- Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D** (1994). Superoxide dismutases in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 13, 199-218
- Bowley SR, Kielly GA, Anandarajah K, McKersie BD, Senaratna T** (1993) Field-evaluation following two cycles of backcross transfer of somatic embryogenesis of commercial alfalfa germplasm. *Canadian Journal of Plant Science* 73, 131-137
- Burlina A, Galzigna L** (1972) A new and simple procedure for serum arylesterase. *Clinica Chimica Acta* 39, 255-257

- Cacmak I, Strbac D, Marschner H** (1993) Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germination wheat seeds. *Journal of Experimental Botany* 44, 127-132
- Carlberg i Mannervik B** (1985) Glutathione reductase. *Methods of Enzymology* 113, 484-490.
- Cassels AC, Croke JT, Doyle BM** (1997) Evaluation of image analysis, flow cytometry and RAPD analysis for the assessment of somaclonal variation and induced mutation in tissue-culture derived *Pelargonium* plants. *Angewandte Botanik* 71, 119-124
- Cassels AC, Kowalski B, Fitzgerald DM, Murphy GA** (1999) The use of image analysis for study developmental variation in micropropagated potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Research* 42, 541-548
- Cassels AC, Curry RF** (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64, 145-157
- Charrière F, Sotta B, Miginiac E, Hahne G** (1999) Induction of adventitious or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiology and Biochemistry* 37, 751-757
- Chapman A, Blervacq AS, Vasseur J, Hilbert JL** (2000) Arabinogalactan protein in *Cichorium* somatic embryogenesis effect of beta-glucosyl Yariv reagent and epitope localization during somatic embryo development. *Planta* 211, 305-314
- Charles SA, Halliwell B** (1980) Effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose biosphosphatase. *Biochemical Journal* 189, 132-138
- Cheliak WM, Pitel JA** (1985) Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Canadian Service Information Report PI-X-42F. Petawa National Forestry Institute, Chalk River, Ontario
- Chen Y, Zhang J, Li XE** (1993) Temperature requirements for afterripening of the embryo of *Fritillaria cirrhosa* Don.f. *China Journal of Chinese Materia Medica* 18, 270-272

- Chen UC, Tai CD, Chen CC, Tsay HS** (2000) Studies on the tissue culture of *Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia III. Influence of medium component and light treatment on *in vitro* rooting and acclimatization of bulblet. Journal of Agricultural Research of China 49, 39-47
- Chibbar R, Shylu J, Georges F, Mallard C, Constabel F** (1988) Esterase isozymes as markers of somatic embryogenesis in cultured carrot cells. Journal of Plant Physiology 133, 367-370
- Chuck G, Hake S** (2005) Regulation of developmental transition. Current Opinion in Plant Biology 8, 65-70
- Clare DA, Rabinowitch HD, Fridovich I** (1984) Superoxide dismutase and chilling injury in *Chlorella ellipsoidea*. Archive of Biochemistry and Biophysics 231, 158-163
- Coimbra S, Costa M, Jones B, Mendes MA, Pereira LG** (2009) Pollen grain development is comprised in *Arabidopsis* agp6 agp11 null mutants. Journal of Experimental Botany 60, 3133-3142
- Coppens L, Dewite D** (1990) Esterase and peroxidase zymograms from barley (*Hordeum vulgare*) callus as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis. Plant Science 67, 97-105
- Cordewener J, Booij H, Van der Zandt H, Van Engelen F, Van Kammen A, De Vries SC** (1991) Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be secreted cationic peroxidase isoenzymes. Planta 184, 478-486
- Corneanu GC, Popescu GG** (1981) Distributional and anatomical studies on *Fritillaria (Liliaceae)* in Romania. Willdenowia 11, 307-315
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Chevalier C, Lamattina L** (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. Journal of Experimental Botany 57, 581-588
- Coskun Y, Duran RE, Savaskan C** (2010) Influential effects of arabinogalactan proteins on plant regeneration using calli derived from wheat mature embryos. African Journal of Agricultural Research 5, 2439-2445

- Cummins I, Burnet M, Edwards R** (2001) Biochemical characterization of esterase active in hydrolysing xenobiotics in wheat and competing weeds. *Physiologia Plantarum* 113, 477-485
- Curry RF, Cassels AC** (1998) Callus initiation, maintenance and shoot induction: monitoring of spontaneous genetic variability *in vitro* and *in vivo*. In: Hall RH (eds.) *Methods in Molecular Biology* 7, Humana Press, New York, pp 31-42
- Dat J, Vandenaabeele J, Vranova E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of active oxygen species during plant stress responses. *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 779-795
- Davletova S, Meszaros T, Miskolczi P, Oberschall A, Torok K, Magyar Z, Dudits D, Daek M** (2001) Auxin and heat shock activation of a novel member of calmodulin like domain protein kinase gene family alfalfa cells. *Journal of Experimental Botany* 52, 215-221
- Debergh PC, Zimmerman RH** (1990) Micropropagation technology and application. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds.), *The Plant Production*, Kluwer Academic Publisher, pp. 363-388
- Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen D, Grout B, Von Arnold S, Zimmerman R, Ziv M** (1992) Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 30, 135-140
- De Carvalho VM, Marques RM, Lapenta AS, Machado MFPS** (2003) Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (*Apocynaceae*). *Genetics and Molecular Biology* 26, 195-198
- De Jong A, Cordewener J, LoSchiavo F, Terzi M, Vandekerckhove J, Van Kammen A, De Vries S** (1992) A carrot somatic embryo is rescued by chitinase. *Plant Cell* 4, 425-433
- De Jong AJ, Hendriks T, Meijer EA, Penning M, Loschiavo F, Terzi M, Van Kammen A, De Vries SC** (1995) Transient reduction in secreted 32 kD chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variants ts11. *Genetics and Development* 16, 332-343

- De Hertogh AA, Le Nard M** (1993) Physiological and biochemical aspects of flower bulbs. In: De Hertogh AA, Le Nard M, (eds.), The physiology of flower bulbs. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier pp. 53-69
- De Klerk GJ, Delavalée I i Paffen A** (1992) Dormancy release of micropropagation bulblets of *Lilium speciosum* after long culture in soil. Horticultural Science 27, 147-148
- De Klerk GJ** (2009) A cold treatment promotes both sprouting and sink strength of lily bulblets. Propagation of Ornamental Plants 9, 102-106
- Delavallée I, Paffen A i De Klerk GJ** (1990) The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated *in vitro* II. The effect of temperature. Physiologia Plantarum 80, 431-436
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M** (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. Journal of Experimental Botany 48, 1493-1509
- Dodeman VL, Ducreux G** (1996) Total protein pattern in zygotic and somatic embryogenesis in carrot. Plant Cell Report 16, 101-105
- Domon JM, Dumas B, Laine E, Meyer Y, David A, David H** (1995) Three glycosylated polypeptides secreted by several embryogenic cell cultures of pine show highly specific serological affinity to antibodies directed against the wheat germin apoprotein monomer. Plant Physiology 108, 141-148
- Domon JM, Neutelings G, Roger D, David A, David H** (2000) A basic chitinase-like protein secreted by embryogenic tissue of *Pinus caribea* acts on arabinogalactan proteins extracted from the same cell lines. Journal of Plant Physiology 156, 33-39
- Du H, Simpson RJ, Clarke AE, Bačić A** (1996) Molecular characterization of a stigma-specific gene encoding an arabinogalactan-protein (AGP) from *Nicotiana glauca*. Plant Journal 9, 313-323
- Dudits D, Bögre L, Györgyey J** (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. Journal of Cell Science 99, 475-484

- Dudits D, Gyorgyey J, Bogre L, Bako L** (1995) Molecular biology of somatic embryogenesis. In: Thorpe, Trevor A. (eds.), *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 267-308
- Edge R, McCarvey DJ, Truscott TJ** (1997) The carotenoids as anti-oxidants: A review. *A Journal of Photochemistry and Photobiology* 41, 189-200
- 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.
- Egertsdotter U** (1998) Somatic embryogenesis in forest trees: the regulation of somatic embryo development in conifers. Development of integrated systems for large-scale propagation of elite plants using *in vitro* techniques. COST 822, Report activities, 1996, European Commission 1998, Luxemborg , pp.276-227
- Ellis M, Egelund J, Schultz CJ, Bacic A** (2010) Arabinogalactan-proteins: Key regulators at the cell surface? *Plant Physiology* 153, 403-419
- Elstner EE, Wagner GA, Schutz W** (1988) Activated oxygen in green plants in relation to stress situation. *Current Topics Plant Biochemistry and Physiology* 7, 159-187
- Elstner EF** (1991) Mechanism of oxygen activation in different compartments of plant cell. In: Pell EJ, Steffen KL, (eds.) *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*, Rockville, MD: American Society of Plant Physiologist, pp. 13-25
- Esqueda M, Oropeza M, De Gracia E** (1998) Extracellular proteins secreted in the culture medium of embryogenic and nonembryogenic suspensions of sugarcane (*Saccharum* sp. L.) cv. 78-1. *Acta Cientifica Venezolana* 49, 160-165
- Fadzillah NM, Gill V, Finch PR, Burdon RH** (1996) Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Planta* 199, 552-556
- Faure O, Arrouf J, Nougarede A** (1996) Importance of arabinogalactan proteins for precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia Plantarum* 93, 334-345
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D** (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 74, 201-228

- Fehér A** (2005) Why Somatic Cell Start to form Embryos?. In: Plant Cell Monogr (2) Mujib A, Šamaj J (eds.) Somatic Embryogenesis, Springer, Heidelberg, pp. 85-101
- Feng Y, Gu DZ, Wang YP, Jiang YT** (2009) Establishment of *in vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration system of wildly *Fritillaria ussuirensis* Maxim. Seed 1, 32-36
- Filmus J, Cappuro M, Rast J** (2008) Glypicans. Genome Biology 9, 224
- Fincher GB, Stone BA, Clarke AE** (1983) Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. Annual Review of Plant Physiology 34, 47-70
- Fontaine O, Huault C, Pavis N, Billard JP** (1994) Dormancy breakage of *Hordeum vulgare* seeds: effects of hydrogen peroxide and stratification on glutathione and glutathione reductase activity. Plant Physiology and Biochemistry 32, 677-683
- Frehner M, Keller F, Wiemken A** (1984) Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). Journal of Plant Physiology 116, 197-208
- Gaffe J, Tiznado ME, Handa AK** (1997) Characterization and functional expression of a ubiquitously expressed tomato pectin methyl esterase. Plant Physiology 114, 1547-1556
- Gaj MD** (2001) Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 64, 39-46
- Galiba G, Kerepesi I, Snape JW, Sutka J** (1997) Location of a gene regulating cold-induced carbohydrate production on chromosome 5A of wheat. Theoretical and applied genetics 95, 265-270
- Ganesan M, Jayabalan N** (2004) Evaluation of hemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2), Plant Cell Reports 23, 181-187
- Gao, M, Showalter AM** (1999): Yariv reagent treatment induces programmed cell death in *Arabidopsis* cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement. The Plant Journal, 19 (3):321-331.

Gao SL, Zhu DN, Cai ZH, Jiang Y, Xu DR (1999) Organ culture of a precious Chinese medical plant – *Fritillaria unibracteata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 59, 197-201

Gaspar TH, Penel CL, Thorpe T, Grappin H (1982) Chemistry and biochemistry of peroxidases. In: Peroxidases, a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants In: Gaspar TH, Penel CL, Thorpe T, Grappin H, (eds.), University of Geneva Press, pp. 10-60

Gaspar (1998) Plants can get cancer. Plant Physiology and Biochemistry 36, 203-204

Gaspar Y., Johnson K. L., Mekenna J. A., Bačić A., Scults C. J. (2001) The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. Plant Molecular Biology., 47: 161-176

Gerrits MM, Kim KS i De Klerk GJM (1992) Hormonal control of dormancy in bulblets of *lilium speciosum* cultured *in vitro*. Acta Horticulturae 325, 521-527

Gilamore AM (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection of higher plant chloroplasts and leaves. Physiologia Plantarum 99, 197-209

Goebel-Tourand I, Mauro MC, Sossoutzov L, Miginiac E, Deloire A (1993) Arrest of somatic embryo development in grapevine: histological characterization and effect of ABA, BAP and zeatin in stimulating plantlet development. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 33, 91-103

Gomez JM, Hernandez JA, Jimenez A, Del Rio LA, Sevilla F (1999). Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. Free radical Research Supplement 31, 11-18

Gorin N, Heidema FT (1985) Starch content of freeze-dried anthers and alpha-amylase activity of their extracts as criteria that dried-stored bulbs (*Tulipa gesneriana* L.) ‘Apeldoorn’ have been exposed to 5 °C. Scientia Horticulturae 26, 183-189

Grossmann K (2000) Mode of action of auxinic herbicides: a new ending to a long, drawn out story. Trends in Plant Science 5, 506-508

Haccius B (1978) Question of unicellular origin of non-zigotic embryos in callus cultures. Phytomorphology 28, 74-81

- Haensch KT** (1996) Plant regeneration through somatic embryogenesis in different genotypes of *Lilium* hybrids. *Gartenbauw* 61, 214-218
- Hahne G, Mayer JE, Lörz H** (1988) Embryogenic and callus-specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, *Dactylis glomerata* L. *Plant Science* 55, 267-279
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (1989) Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 936
- Halperin W** (1969) Morphogenesis in cell culture. *Annual Review of Plant Physiology* 20, 395-418
- Halperin W, Jensen WA** (1967) Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *Journal of Ultrastructure Research* 18, 428-443
- Halperin W, Wetherell DF** (1964) Adventive embryony in tissue culture of the wild carrot, *Daucus carota*. *American Journal of Botany* 512, 274-283
- Hao YR, Li MS, Wu YW** (1982) Callus induction and plant regeneration in tissue culture of *Fritillaria pallidiflora*. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica* 2, 38-43
- Hao Z, Zebin C, Liangxian Y** (1995) Organ regeneration and somatic embryogenesis from young stems of *Fritillaria sinica*. *Journal of West China University of Medical Science* 18, 33-37
- Hendricks SB, Taylorson RB** (1975) Breaking of seed dormancy by catalase inhibition. *Proceedings of National Academic Science of USA* 72, 306-309
- Hendry GAF** (1993) Evolutionary origins and natural functions of fructans: a climatological, biogeographical and mechanical appraisal. *New Phytology* 123, 3-14
- Hernandez JA, Jimenez A, Mullineaux P, Sevilla F** (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum*) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell and Environment* 23, 853-862
- Hernández-Nistal J, Dopico B, Labrador E** (2002) Cold and salt stress regulates the expression and activity of chickpea cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase. *Plant Science* 163, 507-514
- Higuchi H, Sisa M** (1967) Serological analysis on the change of protein in scaly leaf tulip bulb caused by low temperature treatment. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 36, 55-60

- Hilaire KT, Daouda K, Michel Z, Justin KY** (2007) Esterase isoenzymes are linked to embryogenic structures induction in cotton cell suspension cultures. *African Journal of Agricultural Research* 2, 394-398
- Hilbert J, Dubois T, Vsseur J** (1992) Detection of embryogenesis-related proteins during somatic embryo formation in *Cichorium*. *Plant Physiology and Biochemistry* 30, 733-741
- Hinz SWA, Verhoef R, Schols HA, Vincken JP, Voragen AGJ** (2005) Type I arabinogalactan contains β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp structural elements. *Carbohydrate Research* 340, 2135-2143
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H** (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology* 42, 462-468
- Hobson GE, Davies JN** (1977) Mitochondrial activity and carbohydrate levels in tulip bulbs in relation to cold treatment. *Journal of Experimental Botany* 28, 559-568
- Hodges DM, Andrews CJ, Johnson DA, Hamilton RI** (1997) Antioxidant enzyme responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Journal of Experimental Botany* 48, 1105-1113
- Hodges DM, Andrews CJ, Johnson DA, Hamilton RI** (1997) Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids. *Crop Science* 37, 857-863
- Hofmann N, Nelson RL, Korban SS** (2004) Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 77, 157-163
- Holmes RS, Masters CJ** (1967) The development multiplicity and isoenzyme status of cavian esterases. *Biochimica and Biophysica Acta* 132, 379-399
- Hrubcová M, Cvirková M, Eder J** (1994) Peroxidase activities and content of phenolic acids in embryogenic and non-embryogenic alfalfa cell suspension cultures. *Biologia Plantarum* 39, 175-182
- Hrubcová M, Cvirková M, Eder J** (1994) Peroxidase activities and content of phenolic acids in embryogenic and nonembryogenic alfalfa cell suspension cultures. *Biologia Plantarum* 39, 175-182

- Hulcher M, Krijgheld HT, Van Der Linde PCG** (1992) Propagation of shoots and bulb growth of tulip *in vitro*. *Acta Horticulturae* 325, 441-446
- Hutchinson MI, Krismha S, Saxena PK** (1996) Morphological and physiological changes during thidiazuron induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium hortorum* L.) hypocotil culture. *International Journal of Plant Science* 157, 110-117
- Huyste VRB, Carnis WL** (1982) Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development. *Photochemistry* 21, 1843-1847
- Huystee VRB** (1987) Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthesis studies. *Annual Review of Plant Physiology* 38, 205-219
- Ikedai-Iwai M, Umehara M, Satoh S, Kamada H** (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 34, 107-114
- Inzé D, Van Montagu M** (1995) Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 6, 153-158
- Inzé D, Van Montagu M** (2002) *Oxidative Stress in Plants*. Taylor and Francis, New York
- Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS** (1998) Somaclonal variations and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Janda T, Szalai G, Gonzales RR, Veisz O, Paldi E** (2003) Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science* 164, 301-306
- Janhke LS, Hull MR, Long SP** (1991) Chilling stress and oxygen metabolism enzymes in *Zea mays* and *Zea diploperennis*. *Plant Cell Environment* 14, 97-104
- Jauh G Y, Lord E M** (1996): Localisation of pectins and arabinogalactan-proteins in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube. *Planta* 204, 450-458.
- Jensen WA** (1962): *Botanical histochemistry: principles and practices*. WH Freeman, and Company, San Francisco
- Jevremović S, Petrić M, Živković S, Trifunović M, Subotić, S** (2010) Superoxide dismutase activity and isoenzyme profiles in bulbs of snake's head fritillary in response to cold treatment. *Archives of Biological Sciences* **62 (3)**, 553-558
- Jevremović S** (2007) Fiziološki, citološki i biohemijski aspekti regeneracije biljaka *Iris* spp. u kulturi *in vitro*, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

- Jia SR, Kumar PP, Kush A** (1996) Oxidative stress in *Agrobacterium*-induced tumors on Kalanchoe plants. *Plant Journal* 10, 545-551
- Jiménez A, Hernandez JA, Pastori G, del Rio LA, Sevilla F** (1998) Role of ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisome in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology* 118, 1327-1335
- Jiménez VM** (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13, 196-223
- Joshi SK, Dhar U, Andola HC** (2007) *In vitro* bulblet regeneration and evaluation of *Fritillaria roylei* Hook. - a high value medicinal herb of the Himalaya. *Acta Horticulturae* 756, 75-83
- Kairong C, Ji L, Gengmei X, Jianlong L, Lihong W, Yafu W** (2002) Effect of hydrogen peroxide on synthesis of proteins during somatic embryogenesis in *Lycium barbarum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68, 187-193
- Kamada H, Kobayashi K, Kiyosue T, Harada H** (1989) Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 25, 1163-1166
- Kamada H, Ishikawa K, Saga H, Harada H** (1993) Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tissue Culture Letters* 10, 38-44
- Kamari G, Phitos D** (2006) Karyosystematic study of *Fritillaria messanensis* (*Liliaceae*). *Willdenowia* 36, 217-233
- Kamenetsky R, Zemah H, Ranawala AP, Vergeldt F, Rawala NK, Miller WB, Van As H, Bendel P** (2003) Water status and carbohydrate pools in tulip bulbs during dormancy release. *New Phytologist* 158, 109-118
- Kaminaka H, Morita S, Tokumoto M, Tanaka K** (1999) Differential gene expression of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. *Free Radical Research* 31, 219-225
- Kaneko K, Tanaka M, Nakaoka U, Tanaka Y, Yoshida N, Mitsuhashi H** (1981) Camtschatcanidine, an alkaloid from *Fritillaria camtschatensis*. *Phytochemistry* 20, 327-329

- Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY, Guy CL** (2004) Exploring the Temperature-Stress Metabolism of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136, 4159-4168
- Karami O, Aghavaisi B, Pour AM** (2009) Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Journal of Chemical Biology* 2, 177-190
- Karami O, Saidi A** (2010) The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports* 37, 2493-2507
- Karp A, Isaac PG, Ingram DS** (1998) Molecular tools for screening biodiversity. Chapman & Hall, Thompson Science, London
- Kasprzewska A** (2003) Plant chitinases-regulation and function. *Cellular and Molecular Biology Letters* 8, 809-824
- Kawaguchi K, Shibua N, Ishii P** (1996) A novel tetrasaccharide, with a structure similar to the terminal sequence of an arabinogalactan-protein accumulates in rice anthers in a stage specific manner. *Plant Journal* 9, 777-785.
- Kerdnaimongkol K, Woodson WR** (1999) Inhibition of catalase by antisense RNA increases susceptibility to oxidative stress and chilling injury in transgenic tomato plants. *Journal of American Society of Horticultural Science* 124, 330-336
- Kim KS** (1991) The effect of growth regulators, temperature and sucrose on the dormancy in *Lilium speciosum* bulblets cultured *in vitro*. *Korean Journal of Plant Tissue Culture* 18, 103-111
- Kim KS, Davelaar E, De Klerk GJ** (1994) Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 90, 59-64
- Kim JB, Raemakers CJJM, Jacobsen E, Visser RGF** (2006) Efficient somatic embryogenesis in *Alstromeria*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86, 233-238
- Kizil S, Arslan N, Ölmez-Bayhan, Khawar KM** (2008) Effects of different planting dates on improving yield of *Fritillaria imperialis* L. and *Fritillaria persica* L. bulbs damaged by small narcissus fly (*Eumerus strigatus* Fallen). *African Journal of Biotechnology* 7, 4454-4458

- Kjellbom P, Snogerup L, Stöhr L, Reuyeau C, McCabe P F, Pennel RI (1997):** Oxidative cross-linking of plasma membrane arabinogalactan proteins. *Plant Journal*, 12: 1189-1196
- Knox JP (1997)** The use of antibodies to study the architecture and development regulation of plant cell walls. *International Review of Cytology* 171, 79-120
- Kormutak A, Salaj T, Matusova R, Vookova B (2003)** Biochemistry of zygotic and somatic embryogenesis in silver fir (*Abies alba* Mill.). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 45, 59-62
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000)** Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 97, 2940-2945
- Kreuger M, Van Holst GJ (1993)** Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta* 189, 243-248
- Kreuger M, van Holst GJ (1995):** Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 197: 135-141.
- Krishnaraj S., Vasil I. K (1995)** Somatic embryogenesis in herbaceous monocots. In: *In vitro* Embryogenesis in Plants. In: T. A. Thorpe (eds.) Kluwer Academic Publishers Dordrecht, pp. 417-470.
- Kukavica B i Veljović-Jovanović S (2004)** Scence-related changes in the antioxidant status of ginkgo and birch leaves during autumn yellowing. *Physiologia Plantarum* 122, 321-327
- Kukulezanka K, Kromor K, Czastka B (1989)** Propagation of *Fritillaria meleagris* L. through tissue culture. *Acta Horticulturae* 251, 147-153
- Kumar JV, Kumari BDR, Castaño E (2008)** Cyclic somatic embryogenesis and efficient plant regeneration from callus of sunflower. *Biologia Plantarum* 52, 429-436
- Kurepa J, Hérouart D, van Montagu M, Inzé D (1997)** Differential expression of CuZn- and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress, and hormonal treatments. *Plant Cell Physiology* 38, 463-470

- Lambe P, Mutambel HSN, Fouche JG, Deltour R, Foidart JM, Gaspar T (1997)** DNA methylation of organogenesis totipotency and plant neoplastic progression? *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 33, 155-162
- Lane BG, Dunwell JM, Ray J, Schmitt MR, Cuming AC (1993)** Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 268, 12239-12242
- Langens-Gerrits MM, Miller WB, Lilien-Kipins H, Kollöffel C, Croes T, De Klerk GJ (1997)** Bulb growth in lily regenerated *in vitro*. *Acta Horticulturae* 430, 267-273
- Langens-Gerrits MM, Nashimoto S, Croes AF i De Klerk GJ (2001)** Development of dormancy in different lily genotypes regenerated *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 34, 215-222
- Langens-Gerrits MM, Miller WBM, Croes AF, Klerk GJ (2003a)** Effect of low temperature on dormancy breaking and growth after planting in lily bulblets regarded *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 40, 267-275
- Langens-Gerrits MM, Klerk GJ, Croes A (2003b)** Phase change in lily bulblets regenerated *in vitro*. *Physiologia Plantarum* 119(4), 590-597
- Larson RA (1988)** The antioxidant of higher plants. *Phytochemistry* 27, 969-978
- Lavid N, Schwartz A, Lewinsohn E, Tel-Or E (2001a)** Phenols and phenol oxidases are involved in cadmium accumulation in the water plants *Nymphoides peltata* (*Menyanthaceae*) and *Nymphaeaceae* (*Nymphaeaceae*). *Planta* 214, 189-195
- Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E (2001b)** The involvement of polyphenols and peroxidases activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (*Nymphaeaceae*). *Planta* 212, 323-331
- Lee CB, Swatek KN, McClure B (2008)** Pollen proteins bind to the C-terminal domain of *Nicotiana glauca* pistil arabinogalactan proteins. *Journal of Biological Chemistry* 283, 26965-26973
- Lee DH, Lee CB (2000)** Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel activity. *Plant Science* 159, 75-85

- Lee HS, Kim KY, You SH, Kwon SY, Kwak SS** (1999) Molecular characterization and expression of cDNA encoding Cu/Zn-SOD from cultured cells of cassava (*Manihot sculenta* Crantz). *Molecular and General Genetics* 262, 807-814
- Ledesma A, Reate MI, Racea R, Burba JL** (1980) Effect of low temperature and preplanting storage time on garlic clonal type. *Rosado Paraguay Growth. Phytion* 39, 37-48
- Le Nard** (1983) Physiology and storage of bulbs: concept and nature of dormancy in bulbs. In: Liberman M. (eds.), *Post Harvest Physiology and Crop preservation*, NATO Advanced study Institute, Series A: Life science. Plenum Press, New York, pp. 191-230
- Le Nard M, De Hertogh AA** (1993) Bulb growth and development and flowering: In De Hertogh A, Le Nard M (eds.) *Physiology of Flower Bulbs*, Elsevier, Amsterdam pp. 29-43
- Leljak-Levanić D, Naana B, Jelaska MS** (2004) Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Report* 23, 120-127
- Leshem B, Lillien-Kipins H, Steintiy B** (1982) The effect of light and of explant orientation on the regeneration and subsequent growth of bulblets of *Lilium longiflorum* Thumb. Bulb scale section cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 17, 129-136
- Li CJ, Qin ZD** (1987) The relationship between physiological and biochemical changes and releasing dormancy of *Fritillaria pallidiflora* Schrenk. during low temperature treatment. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica* 7, 23-28
- Li HJ, Jiang Y, Li P** (2006) Chemistry, bioactivity and geographical diversity of steroidal alkaloids from the *Liliaceae* family. *Natural Product Reports* 23, 735-752
- Li K, Wu W, Zheng Y, Dai Y, Xiang L, Liao K** (2009) Genetic diversity of *Fritillaria* from Sichuan province based on ISSR. *China Journal of Chinese Materia Medica* 34, 2149-2154
- Lichtenhaler HK** (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods of enzymology* 148, 350-382
- Lim YS, McLaughlin T, Sung TC, Santiago A, Lee KE, O'Leary DDM** (2008) p75 mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron* 59, 746-758

- Lin G, Li P, Li SL, Chan SW** (2001) Chromatographic analysis of *Fritillaria* isosteroidal alkaloids, the active ingredients of Beimu, the antitussive traditional Chinese medicinal herb. *Journal of Chromatography A* 935, 321-338
- Linsmaier EM, Skoog F** (1964) Organic Growth Factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18, 100-127
- Liu Y, Wang W, Li Z** (1996) Experiment on the rapid reproduction of *Fritillaria taipaiensis* P.Y. Li. *China Journal of Chinese Materia Medica* 21, 15-7
- Liu H, Ding K, Li P, Zhang C, Xu G** (1997) Microscopic identification of beimu grown in Yunnan province. *China Journal of Chinese Materia Medica* 22, 716-719
- Luciani GF, Mary AK, Pellegrini C, Curvetto NR** (2006) Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 87, 139-143
- Lukaszewska AJ, Witomska M, Bianco J, Barthe P** (1998) ABA contents and the regeneration ability of *Fritillaria imperialis* L. cultured *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum* 20, 241-244
- Lutatkin AS** (2002) Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: 2. The activity of antioxidant enzymes during plant chilling. *Russian Journal of Plant Physiology* 49, 782-788
- Maratoja R i Maratoja M** (1967): *Initiation aux techniques de l'histologie animal*. Masson et Cie, Paris
- Majewska-Sawka A., Nothnagel E.A.** (2000): The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiology* 122, 3-9.
- Mau S. L., Chen C. G., Pu Z. Y., Moritz R. L., Simpson R. J., Bačić A.** (1995): Molecular cloning of cDNAs encoding the protein backbones of arabinogalactan proteins from the filtrate of suspension-cultured cells of *Pyrus communis* and *Nicotiana glauca*. *Plant Journal* 8, 269-281.
- Mareck A, Gaffe J, Morvan O, Alexandre C, Morvan C** (1995) Characterisation of isoforms of pectin methylesterase of *Linum usitatissimum* using polyclonal antibodies. *Plant Cell Physiology* 36, 409-417

- Mashiguchi K, Urakami E, Hasegawa M, Sanmiya K, Matsumoto I, Asami T, Suzuki J** (2008) Defence related signaling by interaction of arabinogalactan proteins and β -glucosyl Yariv reagent inhibits gibberellin signaling in barley aleurone cell. *Plant Cell Physiology* 49, 178-190
- Masuda H, Takahashi T, Sugawara S** (1988) Acid and alkaline invertases in suspension cultures of sugar beet cells. *Plant Physiology* 86, 312-317
- Maurer JB, Bačić A, Pereira-Netto AB, Donatti L, Zawadzki-Baggio SF, Pettolino FA** (2010) Arabinogalactan-protein from cell suspension culture of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* 71, 1400-1409
- Merkle SA, Parrott WA, Williams EG** (1990) Application of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: Bhojwani SS (Eds.) *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. Amsterdam, Elsevier, pp. 67-101
- Martinez CA, Loureiro ME, Oliva MA, Maestri M** (2001) Differential response of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Science* 160, 505-515
- McKersie BD, Murnaghan J, Bowley SR** (1997) Manipulating freezing tolerance in transgenic plants. *Acta Physiologia Plantarum* 19, 485-495
- McKersie BD, Bowley SR, Jones KS** (1999) Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiology* 119, 839-847
- McMillan CP, Mansfield SD, Stachurski ZH, Evans R, Southerton SG** (2010) Fasciclin-like arabinogalactan proteins: specialization for stem biomechanics and cell wall architecture in *Arabidopsis* and *Eucalyptus*. *The Plant Journal* 62, 689-703
- Meneses A, Flores D, Munos M, Arrieta G, Espinosa AM** (2005) Effect of 2,4-D, hydric stress and light on *indica* rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. *International Journal of Tropical Biology* 53, 361-368
- Michalski WP** (1996) Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. *Journal of Chromatography B* 684, 59-75
- Micheli F** (2001) Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Sciences* 6, 414-419

- Mihaljević S, Radić S, Bauer N, Garić R, Mihaljević B, Horvat G, Ljeljak-Levanić D, Jelaska S** (2011) Ammonium-related metabolic changes affect somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). *Journal of Plant Physiology* 168, 1943-1951
- Miller AF** (2004) Superoxide dismutases: active site that save, but a protein that kills. *Current Opinion in Chemical Biology* 8, 162-168
- Miller WBM i Langhans RW** (1990) Low temperatures alters carbohydrate metabolism in Easter lily bulbs. *Horticultural Science* 25, 463-465
- Mirici S, Parmaksiz I, Ozcan S, Sancak C, Uranbey S, Sarihan EO, Gumuscu A, Gurbuz B, Arslan N** (2005) Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endangered *Sternbergia fischeriana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 80, 239-246
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405-410
- Mizuno M, Kamei M, Tsuchida H** (1998) Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. *Biochemistry and Molecular Biology International* 44, 717-726
- Mo L, Egertsdotter U, Von Arnold S** (1996) Secretion of specific extracellular proteins by somatic embryos of *Picea abies* is dependent on embryo morphology. *Annals of Botany* 77, 143-152
- Mohammadi-Dehchesmeh M, Khalighi A, Naderi R, Ebrahimie E, Sardari M** (2007) Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10, 1875-1879
- Mohamadi-Dehcheshmeh M, Khalighi A, Naderi R, Saradi M, Ebrahimie E** (2008) Petal: a reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild population of *Fritillaria imperialis* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 30, 395-399

- Mollard A, Domon JM, David H, Joseleau SP** (1997) Xylose rich polysaccharides from the primary walls of embryogenic cell lines of *Pinus caribea*. International Journal of Biological Macromolecules 21, 189-194
- Moltrasio R, Robredo CG, Gomez MC, Leo AHD, Diaz DG, Rios RD, Franzone PM** (2004) Alfalfa (*Medicago sativa*) somatic embryogenesis: Genetic control and introduction of favorable alleles into elite Argentinean germplasm. Plant Cell Tissue and Organ Culture 77, 119-124
- Mordhorst AP, Toonen MAJ, De Vries SC** (1997) Plant Embryogenesis. Critical Review of Plant Science 16 (6), 535-576
- Moriconi DN, Conci VC, Nome SF** (1990) Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) *in vitro*. Phyton 51, 145-151
- Motose H, Sugiyama M, Fukuda H** (2004) A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. Nature 429, 873-878
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-497
- Nalawade SM, Sagare AP, Lee CY, Kao CL, Tsay HS** (2003) Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. Botanical Bulletin of Academia Sinica 44, 79-98
- Naohiro N, Kenji W** (2006) *Fritillaria tokushimensis* (Liliaceae) is thought to be a natural hybrid. Journal of Phytogeography and Taxonomy 54, 35-44
- Nayak NR, Patnaik S, Rath SP** (1997) Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe Praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. Plant Cell Report 17, 913-916
- Neumann KH** (2000) Some studies on somatic embryogenesis: A tool in plant biotechnology <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2000/321/>
- Nhut DT, Le BV, Minh T, de Silva JT, Fukai S, Tanaka M, Van KTT** (2002) Somatic embryogenesis through pseudobulblet thin layer of *Lilium longiflorum*. Plant Growth Regulators 37, 193-198

- Nikolić M, Mišić D, Maksimović V, Jevremović S, Trifunović M, Subotić A** (2008) Effect of low temperature on rooting rate and carbohydrate content of *Fritillaria meleagris* bulbs formed in culture *in vitro*. *Archive of Biological Sciences* 60, 5-6
- Niimi Y, Onozawa T** (1979) *In vitro* bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker. *Scientia Horticulturae* 11, 379-389
- Niimi Y, Endo Y i Arisaka E** (1988) Effects of chilling and GA₃ treatments on breaking dormancy in *Lilium rubellum* Baker bulblets cultured *in vitro*. *Journal of Japanese Societe of Horticultural Science* 57, 250-257
- Nir G, Shulman Y, Fanberstein L. Lavee S** (1986) Changes in the activity of catalase (EC 1.11.1.6) in relation to the dormancy of grapevine (*Vitis vinifera* L.) buds. *Plant Physiology* 81, 1140-1142
- Nishiwaki M, Fujino K, Koda Y, Masuda K, Kikuta Y** (2000) Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. *Planta* 211, 756-759
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 249-279
- Nothnagel EA** (1997): Proteoglycans and related components in plant cells. *Integral Review of Cytology* 174, 195-291.
- Nowak J, Saniewsky M, Rudnicki RM** (1974) Studies on the physiology of hyacinth bulb (*Hyacinthus orientalis*).I. Sugar content and metabolic activities in bulbs exposed to low temperatures. *Journal of Horticultural Science* 49, 383-390
- Ohkawa M, Kitajima J** (1998) Studies on the propagation of *Fritillaria camtschatensis* Ker-Gawl. by *in vitro* culture. I. Characteristics of sprouting, leafiness, flowering and new bulb formation from mother bulb, and bulblet formation from small globule-scale. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 67, 242-248
- Ohkawa M, Nishino K** (1999) Effect of temperature and light intensity on growth of the regenerated bulblet of *Fritillaria camtschatensis* Ker-Gawl. *in vitro* culture. *Plant Propagation* 37, 243-247

- Ohkawa M, Nishino K** (2000) Effects of sucrose and polyethylene glycol on leaf emergence, rooting and bulblet growth of *Fritillaria camtschaticensis* Ker-Gawl. *In vitro* culture. *Environment Control in Biology* 38, 99-103
- Okagami N, Tanno N** (1991) Dormancy in *Dioscorea*: comparison of dormant characters in bulbils of a northern species (*D. opposita*) and southern species (*D. bulbifera* var. *vera*). *Journal of Plant Physiology* 138, 559-565
- Okagami N** (2003) Dormancy in bulbils of several herbaceous plants: Effects of photoperiod, light, temperature, oxygen and gibberellic acid. *Trends in Plant Science* 8, 534-540
- Okubo H, Iwaya-Inoue M, Motooka K, Ishida N, Kano H, Koizumi M** (1997) Monitoring the cold requirements in tulip bulbs by ¹H-NMR imaging. *Acta Horticulturae* 430, 411-415
- Olmos E, Piqueras A, Martinez-Solano JR, Hellin E** (1997) The subcellular localization of peroxidase and implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants. *Plant Science* 130, 97-105
- Otani M, Shimada T** (1997) Micropropagation of *Fritillaria camtschaticensis* (L.) Ker-Gawl., "Kuroyuri". *Bulletin of RIAR, Ishikawa Agricultural College*, 5, 39-44
- Ötvös K, Pasternak TP, Miskolczi P, Domoki M, Dorjgotov D, Szűcs A, Bottka S, Dudits D, Fehér A** (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell culture. *Plant Journal* 43, 849-860
- Özcan S, Parmaksiz I, Mirici S, Çöçü S, Uranbey S, Ipek A, Sancak C, Sarihan E, Gürbüz B, Sevimay CS, Arslan N** (2007) Efficient *in vitro* bulblet regeneration from immature embryos of endemic and endangered geophyte species in *Sternbergia*, *Muscari* and *Fritillaria* Genera. In: Xu Z (eds.) *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*, Springer, Berlin, Germany, pp. 381-383
- Ovečka i Bobák M** (1999) Structural diversity of *Papaver somniferum* L. cell surfaces *in vitro* depending on particular steps of regeneration and morphogenetic program. *Acta Physiologiae Plantarum* 21, 117-126.

- Paek KY, Sung NS, Park CH** (1996) Several factors affecting bulblet regeneration from the culture of scale segment and node – bud in *Fritillaria* as medicinal bulbous plant. *Acta Horticulturae* 440, 499-503
- Paek KY, Murthy HN** (2002) High frequency of bulblet regeneration from bulb scale section of *Fritillaria thunbergii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68, 247-252
- Pan X, Yang X, Lin G, Zhou R, Chen H, Samaj 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
- Park JE, Park JY, Kim YS, Staswick PE, Jeon J, Yun J, Kim SY, Kim J, Lee YH, Park CM** (2007) GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 10036-10046
- Passardi F, Penel C, Dunand C** (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* 9, 534-540
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C** (2005) Peroxidases have more function than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24, 255-265
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D, Fehér A** (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology* 129, 1807-1819
- Patra J, Panda KK, Panda BB** (1997) Differential induction of adaptive responses by paraquat and hydrogen peroxide against the genotoxicity of methyl mercuric chloride, maleic hydrazide and ethyl methyl sulphonate in plant cell *in vivo*. *Mutation Research* 393, 215-222
- Pedroso MC, Pais S** (1995) Factors controlling somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 43, 147-154

- Peles E, Nativ M, Lustig M, Grumet M, Schilling J, Martinez R** (1997) Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interaction. *EMBO Journal* 16, 978-988
- Pell EJ, Schlagnhauser CD, Arteca RN** (1997) Ozone-induced oxidative stress: mechanism of action and reaction. *Physiologia Plantarum* 100, 264-273
- Pennell RI, Roberts K** (1990): Sexual development in the pea is presaged by altered expression of arabinogalactan protein. *Nature*, 344: 547-549.
- Pennell R I, Janniche L, Kjellbom P, Scofield GN, Booij H, de Vries SC, Roberts, K** (1992) Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. *Journal of Cell Biology* 119, 1371-1380.
- Pettolino F, Liao ML, Ying Z, Mau SL, Bacic A** (2006) Structure, function and cloning of arabinogalactan proteins (AGPs): an overview. *Food and Food Ingredients Journal of Japan* 211, 12-25
- Petrić M, Subotić A, Jevremović S, Trifunović M** (2011) Somatic embryogenesis and bulblet regeneration in snakehead fritillary (*Fritillaria meleagris* L.). *African Journal of Biotechnology* 10, 16181-16188
- Pfeiffer W, Hoftberger M** (2001) Oxidative burst in *Chenopodium rubrum* suspension cells: induction by auxin and osmotic changes. *Physiologia Plantarum* 111, 176-183
- Pierik RLM** (1990) Rejuvenation and micropropagation. *Newsletters of International Association of Plant Tissue Culture* 62, 11-21
- Popper ZA** (2011) Extraction and Detection of Arabinogalactan Proteins. In: Zoë Popper (eds.), *The Plant Cell Wall: Methods in Molecular Biology*, Springer Verlag New York, USA, Vol 715, pp. 245-254.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Jansen AK** (2009) Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell and Environment* 32, 158-169
- Pramanik S, Bera TK, Roy SC, Raychaudhuri S** (1994) Esterase isozyme polymorphism in relation to development in different species of *Plantago*. In: Manna GK (eds.), *Perspectives in Cytology and Genetics*, pp. 328-331

- Pramanik S, Sarmistha SR, Chakraborty S** (1996) Changes in esterase and superoxide dismutase isozymes during *in vitro* morphogenesis in *Plantago ovata* Forssk. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44, 123-127
- Preece JE, Sutter EG** (1991) Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse In: Debergh PC and Zimmerman RH (eds.), *Micropropagation: Technology and Applications*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp. 71-94
- Pritchard SL, Charlton WL, Baker A, Graham A** (2002) Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 31, 639-647
- Ptak A, Bach A** (2007) Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem culture. *In vitro Cellular and Developmental Biology* 43, 35-39
- Puntaluro S, Sanches RA, Boveris A** (1988) Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiology* 86, 626-630
- Qi W, Fong C, Lamport DTA** (1991): Gum arabic glycoprotein is a twisted hairy rope. *Plant Physiology* 96, 848-855.
- Qiao HL, Ma XF, Li LY** (1986) Preliminary report of greenhouse production of bulb of *Fritillaria sichuanica*. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 11, 10-11
- Qin Y, Zhao J** (2006) Localization of arabinogalactan proteins in egg cells, zygote and two-cells proembryos and effects of β -D-glucopyranosyl Yariv reagent on egg cell fertilization and zygote division in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Experimental Botany* 57, 2061-2074
- Quiroz-Figueroa FR, Méndez-Zeel M, Sánchez-Teyer F, Rojas-Herrera R, Loyola-Vargas VM** (2002) Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica* L. *Journal of Plant Physiology* 159, 1267-1270
- Quiroz-Figueroa FR, Rafael RH, Galaz-Avalos RM, Loyola-Vargas VM** (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86, 258-301
- Rahman A, Choudhary MI** (1993) Diterpenoid and steroidal alkaloids. *Natural Product Reports* 12, 361-379

- Rahman A, Choudhary MI** (1997) Diterpenoid and steroidal alkaloids. *Natural Products Reports* 14, 191-203
- Rahman A, Akhtar MN, Choudhary MI, Tsuda Y, Sener B, Khalid A, Parvez M** (2002) New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and their cholinesterase inhibiting activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50, 1013-1017
- Rahman MH, Haque MS, Karim MA, Ahmed M** (2006) Effects of gibberellic acid (GA₃) on breaking dormancy in garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal of Agricultural Science* 8, 63-65
- Rahnema H, Ebrahimzadeh H** (2006) Antioxidant isozymes activities in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) under salt stress. *Journal of Science, Islamic Republic of Iran* 17, 225-230
- Rakhimbaev IR, Syrtaanova GA, Solomina VF** (1978) Effect of cold treatment on the level of biological activity of endogenous growth regulation of tulip bulbs. *Fiziologia-Rastenii-Moskow* 25, 249-253
- Rao KV, Suprasanna P, Reddy GM** (1990) Biochemical changes in embryogenic and non-embryogenic calli of *Zea mays* L. *Plant Science* 66, 127-130
- Rebers M, Vermeer E, Knecht E, Shelton CJ, van der Plas HW** (1995) Gibberellin levels and cold-induced floral stalk elongation in tulip. *Physiologia Plantarum* 94, 687-691
- Remacle J, Raes M, Toussaint O, Renard P, Rao G** (1995) Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutation Research* 316, 103-122
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE** (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 707-720
- Rohde A, Bhallerao P** (2007) Plant dormancy in the perennial context. *Trends in Plant Science* 12, 217-223
- Rojas-Beltran JA, Dejaeghere F, Abd Alla Kotb M, Du Jardin P** (2000) Expression and activity of antioxidant enzymes during potato tuber dormancy. *Potato Research* 43, 383-393

- Roy S, Jauh GY, Hepler PK, Lord EM** (1998): Effects of Yariv phenylglycoside on cell wall assembly in the lily pollen tube. *Planta* 204, 450-458.
- Šamaj J, Baluška F, Volkmann D** (1998) Cell specific expression of two arabinogalactan proteine epitopes recognized by monoclonal antibodies JIM 8 and JIM 13 in maize roots. *Protoplasma* 204, 1-12
- Šamaj J, Baluška F, Pretová A, Volkmann D** (2003) Auxin deprivation induces a developmental switch in maize somatic embryogenesis involving redistribution of microtubules and actin filaments from endoplasmic to cortical cytoskeleton arrays. *Plant Cell Reports* 124, 940-945
- Fernandez R, Fricker M, Corben LB, White NS, Sheard N, Leaver CJ, Van Montagu M, Inzé D, May MJ** (1997) Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 94, 2745-2750
- Sandermann H** (1992) Plant Metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Science* 17, 82-84
- Sangwan RS, Bourgeois Y, Brown S, Vasseur G, Sangwan-Norreel B** (1992) Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium* mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 188, 439-456
- Saruyama J, Tanida M** (1995) Effects of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature sensitive and temperature-tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* 109, 105-113
- Sarkar D** (2008) The signal transduction pathways controlling in planta tuberization in potato: An emerging synthesis. *Plant Cell Reports* 27, 1-8
- Scebba F, Sebastiani L, Vitalgiano C** (1998) Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 104, 747-752
- Schiavone FM, Cooke TJ** (1985) A geometric analysis of somatic embryo formation in carrot cell culture. *Canadian Journal of Botany* 63, 1573-1578

- Schindler T, Bergfeld R, Schopfer P** (1995): Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth. *Plant Journal* 7, 25-36.
- Schultz C, Gilson P, Oxley D, Youl J, Bacic A** (1998): GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: implications for signaling in plants. *Trends Plant Science* 3, 426-431.
- Scialabba A, Bellani LM, Dell'Aquila A** (2002) Effects of ageing on peroxidase activity and localization in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *European Journal of Histochemistry* 46, 351-358
- Seifert G, Roberts K** (2007) The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology* 58, 137-161
- Seon JH, Paek KY, Gao WY, Park CH, Sung NS** (1999) Factors affecting micropropagation of pathogen – free stocks in *Fritillaria thunbergii*. *Acta Horticulturae* 502, 333-337
- Senger S, Mock HP, Conrad U, Manteuffel R** (2001) Immunomodulation of ABA function affects early events in somatic embryo development. *Plant Cell Report* 20, 112-120
- Serpe DM., Nothnagel EA** (1995) Fraction and structural characterization of arabinogalactan-proteins from the cell wall of rose cells. *Plant Physiology* 109, 1007-106-16
- Seppänen MM, Majaharju M, Somersalo S, Pehu E** (1998) Freezing tolerance, cold acclimation and oxidative stress in potato. Paraquat tolerance is related to acclimation process but not good indicator of actual freezing tolerance. *Physiologia Plantarum* 102, 454-460
- Seppänen MM, Fagerstedt K** (2000) The role of superoxide dismutase activity in response to cold acclimation in potato. *Physiologia Plantarum* 108, 279-285
- Serpe M D, Nothnagel E A** (1994): Effect of Yariv phenylglycosides on rose cell suspensions: evidence for the involvement of arabinogalactan-protein in cell proliferation. *Planta*, 193: 542-550.

- Sharifi G, Ebrahimzadeh H** (2010) Changes of antioxidant enzyme activity and isoenzyme profiles during *in vitro* shoot formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *Acta Biologica Hungarica* 61, 73-89
- Shen WY, Nada K, Tachibana S** (1999) Effect of cold treatment on enzymatic and nonenzymatic antioxidant activities in leaves of chilling tolerant and chilling sensitive cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* 68, 967-973
- Shibli RA, Ajlouni MM** (2000) Somatic embryogenesis in the endemic black iris. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 61, 15-21
- Shin KS, Chakrabarty D, Paek KY** (2002) Sprouting rate, change of carbohydrate contents and related enzymes during cold treatment of lily bulblets regenerated *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 96, 195-204
- Shiomi N, Onodera S, Sakai S** (1997) Fructo-oligosaccharide content and fructosyltransferase activity during growth of onion bulbs. *New Phytologist* 136, 105-113
- Shiomi N, Benkeblia N, Onodera S** (2005) The metabolism of the fructooligosaccharides in onion bulbs: A comprehensive review. *Journal of Applied Glycoscience* 52, 121-127
- Slabbert MM, Niederwieser JG** (1999) *In vitro* bulblet production of *Lachenalia*. *Plant Cell Reports* 18, 620-624
- Steffen KL, Palta JP** (1987) Photosynthesis as a key process in plant response to low temperature, In: P.H. Li (eds.), *Alteration during low temperature acclimation and impairment during incipient freeze-thaw injury, Plant cold hardiness, Plant Biology* Vol. 5, Alan R. Liss, Inc., New York, NY, pp. 67-99
- Steponkus PL** (1984) Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology* 35, 543-584
- Steward FC, Mapes MO, 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

- Stirn S, Mordhorst A, Fuchs S, Lörz H** (1995) Molecular and biochemical markers for embryogenic potential and regeneration capacity of barley (*Hordeum vulgare* L.) cell culture. *Plant Science* 106, 195-206
- Sgherri C, Stevanović B, Navari-Izzo F** (2004) Role of phenolic in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum* 122, 478-485
- Sharp WR, Sondahl MR, Caldas LS, Maraffa SB** (1980) The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticultural Review* 2, 268-310
- Shiau YJ, Tai CD, Chen CC, Tsay HS** (2000) Studies on the tissue culture of *Fritillaria hupehensis* Hsia et K. C. Hsia I. The induction of bulb scale and embryogenic callus from different source explants. *Journal of Agricultural Research of China* 49, 29-38
- Shin KS, Chakrabarty D, Paek KY** (2002) Sprouting rate, change of carbohydrate contents and related enzymes during cold treatment of lily bulblets regenerated *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 96, 195-204
- Sho I, Michiharu, Testuo N** (1963) On the alkaloid of *Fritillaria verticillate* WILD. var. *Thunbergii* BAKER. II. The structure of verticine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 11, 1337-1340
- Showalter AM** (2001) Arabinogalactan proteins: structure, expression and function. *Cell and Molecular Life Science* 58, 1399-1417
- Showalter AM, Keppler B, Lichtember J, Gu DZ, Weich RL** (2010) A bioinformatics approach to the identification, classification and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiology* 153, 485-513
- Siegel BZ, Galston W** (1967) The peroxidase of *Pisum sativum*. *Plant Physiology* 42, 221-226
- Slabbert MM, Niederwieser JG** (1999) *In vitro* bulblet production of *Lachenalia*. *Plant Cell Reports* 18, 620-624
- Smith DL, Krikorian AD** (1990) Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. *Plant Cell Reports* 9, 468-470

- Specht CE, Keller ERJ** (1997) Temperature requirements for seed germination in species of the genus *Allium* L. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44, 509-517
- Stacey NJ, Roberts K, Knox JP** (1990) Patterns of expression of the JIM 4 arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. *Planta* 180, 285-292.
- Sterk P, Booij H, Schellekens G, Van Kammen A, De Vries S** (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3, 907-921
- Subotić A, Trifunović M, Jevremović S, Petrić M** (2010) Morpho-histological study of direct somatic embryogenesis in endangered species *Fritillaria meleagris*. *Biologia Plantarum* 54, 592-596
- Sun CS, Chu CC, Wang CC** (1977) Callus formation and organ regeneration in the tissue culture of *Fritillaria thunbergii* Miq. *Acta Botanica Sinica* 19, 161-162
- Sun CS, Wang DY** (1991) *Fritillaria* spp. (*Fritillary*): *In vitro* culture and the regeneration of plants. In: Bajaj YPS (eds.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Medicinal and Aromatic Plants III* (1st Edn, Vol XV), Springer, Berlin, Germany, pp. 258-269
- Sun D, Piao XC, Lian JS, Lian ML** (2008) Study on several factors affecting callus growth of *Fritillaria ussuirensis* Maxim. *Northern Horticulture* 4, 218-220
- Sung Z, Okimoto R** (1981) Embryogenic proteins in somatic embryos of carrot. *Proceedings of National Academy of Science USA* 78, 3683-3687
- Tamás L, Huttová J, Mistrík I, Šimonovičová M, Široká B** (2005) Aluminium induced esterase activity and isozyme pattern in barley root tip. *Plant Soil and Environment* 51, 220-225
- Thomas TL** (1993) Gene expression during plant embryogenesis and germination. *Plant Cell* 5, 1401-1410
- Tang XC, He YQ, Wang Y, Sun MX** (2006) The role of arabinogalactan proteins banding to Yariv reagents in the initiation, cell developmental fate and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Journal of Experimental Botany* 57, 2639-2650

- Tanno N, Yokota T, Abe M, Okagami N** (1992) Identification of endogenous gibberellins in dormant bulbils of chinese yam, *Dioscorea opposita*. *Plant Physiology* 100, 1823-1826
- Thomashow MF** (1999) Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 571-599
- Thomson H. J. M., Knox J. P.** (1998): Stage-specific responses of carrot embryogenic carrot cell suspension cultures to arabinogalactan pritein-binding β -glucosil Yariv reagent. *Planta* 205, 32-38.
- Tchorbadjieva M** (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
- Tchorbadjieva M, Odjakova M** (2001) An acidic esterase as a biochemical marker for somatic embryogenesis in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) suspension cultures. *Plant Cell Report* 20, 28-33
- Thorbadjieva M, Pantchev I** (2006) Secretion of chitinase-like protein in embryogenic suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. *Biologia Plantarum* 50, 142-145
- Toonen M, Schmodt E, Hendriks T, Van Kammen D, De Vries S** (1997) Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. *Planta* 203, 188-195
- Tsang EWT, Bowler C, Herouart D, Van Camp W, Villaroel R, Genetello C, Van Montagu M, Inze D** (1991) Differential regulation of superoxide dismutase in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* 3, 783-792
- Tsoi PY, Woo HS, Wong MS, Chen SL, Fong WF, Xiao PG, Yang MS** (2003) Genotyping and species identification of *Fritillaria* by DNA chips. *Acta Pharmaceutica Sinica* 38, 185-190
- Ulug BV, Korkut AB, Sisman, EE, Vuz M** (2010) Research on propagation methods of Persian lily bulbs (*Fritillaria persica* Linn) with various vegetative techniques. *Pakistan Journal of Botany*, 42: 2785-2792

- Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D** (1994) Superoxide dismutases: roles in stress tolerance. In: Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence System in Plants. (eds.) C. H. Foyer and P. M. Mullineaux. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 317-341
- Valente P, Tao W, Verbelen P** (1998) Auxins and cytokonins control DNA endoreduplication and deduplication in single cells of tobacco. *Plant Science* 134, 207-215
- Vanderberghe GC, McIntosh L** (1992) Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. *Plant Physiology* 100, 115-119
- Van Engelen FA, De Vries SC** (1993) Secreted proteins in plant cell cultures. In: Roubelakis-Angelakis KA, Tran Than Van K (eds.) *Morphogenesis in plants*. Plenum Press, New York, pp 181-200
- Van Hengel A, Van Kammen A, De Vries S** (2002) A relationship between seed development, arabinogalactan (AGP), and AGP-mediated promotion of somatic embryogenesis. *Plant Physiology* 114, 637-644
- van Holst GJ, Clarke AE** (1985) Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Annals of Biochemistry* 148, 446-450.
- van Holst GJ, Clarke AE** (1986) Organ-specific arabinogalactan-proteins of *Lycopersicon peruvianum* (Mill.) demonstrated by crossed electrophoresis. *Plant Physiology* 80, 786-789.
- Varner J, Lin L** (1989) Plant Cell wall architecture. *Cell* 56, 231-239
- Vegis** (1964) Dormancy in higher plants. *Annual Review of the Plant Physiology* 15, 185-224
- Veljović-Jovanović S, Kukavica B, Stevanović B, Navari-Izzo F** (2006) Senescence and drought related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. *Journal of Experimental Botany* 57, 1769-1768
- Viteček J, Petrlova J, Petrek J, Adam V, Havel L, Kramer KJ, Kizek R** (2007) Application of fluorimetric analysis of plant esters to study of programmed cell death effects cadmium (II) ions. *Biologia Plantarum* 51, 551-555

- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L** (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69, 233-249
- Vranová E, Van Breusegem F, Dat J, Belles-Boix E, Inzé D** (2002) The role of active oxygen species in plant signal transduction. In: *Plant Signal Transduction*, (Frontiers in Molecular Biology, Vol. 38), D. Scheel, and C. Wasternack (eds.), Oxford, Oxford University Press, pp. 45-73
- Vyas D, Kumar S** (2005) Tea (*Camellia sinensis* L.) clone with lower period of winter dormancy exhibits lesser cellular damage in response to low temperature. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 383-388
- Vyas D, Kumar S, Ahuja PS** (2007) Tea (*Camellia sinensis*) clones with shorter periods of winter dormancy exhibit lower accumulation of reactive oxygen species. *Tea Physiology* 27, 1253-1259
- Walck JL, Cofer MS, Hidayati SN** (2010) Understanding the germination of bulbils from an ecological perspective: a case study on Chinese yam (*Dioscorea polystachya*). *Annals of Botany* 106, 945-955
- Walker MA, McKersie BD** (1993) Role of Ascorbate-Glutathione Antioxidant System in Chilling Resistance of Tomato. *Journal of Plant Physiology* 141, 234-239
- Wang LS, Yang HM, Wang YF, Kung WJ** (1989) Somatic embryogenesis from tissue culture of *Fritillaria pallidiflora* and cytohistological observation. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* 9, 76-81
- Wang Q, Lan LQ, Fu HL** (2002) Induction of polyploid from colchicine-treated *Fritillaria cirrhosa* D. Don callus. *Journal of Wuhan Botanical Research* 20, 449-452
- Wang YH, Bhalla PL** (2004) Somatic embryogenesis from leaf explants of Australian fan flower, *Scaevola aemula* R. Br. *Plant Cell Report* 22, 408-414
- Wang S, Gao W, Chen H, Xiao P** (2005a) New starches from *Fritillaria* species medicinal plants. *Carbohydrate Polymers* 61, 111-114
- Wang S, Gao W, Yu J, Xiao P** (2005b) Identification of *Fritillaria* herbal drugs by X-ray diffraction of starch grains. *China Journal of Chinese Materia Medica* 30, 805-807

- Wang S, Yu J, Gao W** (2005c) Use of X-ray diffractometry (XRD) for identification of *Fritillaria* according to geographical origin. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 1, 199-203
- Wang Q, Zhou SD, Deng XY, Zheng Q, He XY** (2009) Comparative morphology of leaf epidermis in *Fritillaria* (*Liliaceae*) from China. *Botanical Journal of Linnean Society* 160, 93-109
- Wareing PF, Saunders PF** (1971) Hormones and dormancy. *Annual Review of Plant Physiology* 22, 261-288
- Wawrosch C, Malia PR, Kopp B** (2001) Clonal propagation of *Lilium nepalense* D. Don, a threatened medicinal plant of Nepal. *Plant Cell Reports* 20, 285-288
- West MAL, Harada JJ** (1993) Embryogenesis on Higher Plants: An Overview. *The Plant Cell* 5, 1361-1369
- Wetherell DF** (1984) Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 5, 221-227
- Willats WGT, Steele-King C, McCartez L, Orfila C, Marcus S, Knox JP** (2000) Making and using antibody probes to study plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 27-36
- Willats WGT, Knox JP** (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*. *Plant Journal* 9, 919-925.
- Williams EG, Maheswaran G** (1986) Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57, 443-462
- Wingate VPM, Lawton MA, Lamb CJ** (1988) Glutathione causes a massive and selective induction of plant defence genes. *Plant Physiology* 87, 206-210
- Wiseman H, Halliwell B** (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal* 313, 17-29
- Witomska M, Lukaszewska A** (1997) Bulblet regeneration *in vitro* from different explants of *Fritillaria imperialis*. *Acta Horticulturae* 430, 331-338

- Witomska M, Wilk T, Lukaszewska A** (1998) Effect of sterilization method on infection level and regeneration *in vitro* of explants from bulbs of *Fritillaria imperialis* L. Scientific Papers of the Institute of Pomology and Floriculture 5, 121-130
- Wu J, Tang W** (1992) Studies on tissue culture of medicinal plant (*Fritillaria ussuirensis* Maxim) 1. Induction of callus, organogenesis and cytological observation. Journal of Northeast Agricultural University 2, 188-195
- Wu HM, Wong E, Ogdahl J, Cheung AY** (2000): A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. Plant Journal 22, 165-176.
- Yahraus T, Chandra S, Legendre L, Low PS** (1995) Evidence for a mechanically induced oxidative burst. Plant Physiology 109, 1259-1266
- Yamagishi M** (1993) Effects of *in vitro* culture temperature and cold treatment on breakage and dormancy in bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. Bulletin RIAR Ishikawa Agricultural Collection 3, 26-30
- Yamagishi M** (1995) Effect of mannose on enlargement of *in vitro* bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. Bulletin RIAR Ishikawa Agricultural Collection 4, 86-89
- Yamagishi M** (1997) Effects of culture temperature on the enlargement, sugar uptake, starch accumulation, and respiration of *in vitro* bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. Scientia Horticulturae 73, 239-247
- Yamazaki H, Ishida N, Katsura N, Kano H, Nishijima T, Koshioka M** (1995) Changes in carbohydrate composition and water status during bulb development of *Allium wakegi* Araki. Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental plants and Tea, Japan A 10, 1-11
- Yamazaki H, Nishijima T, Koshioka M, Miura H** (2002) Gibberellins do not act against abscisic acid in the regulation of bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki. Plant Growth Regulation 36, 223-229
- Yang SR, Tai CD, Chen CC, Tsay** (2001) Effect of plant growth regulators and status of the medium on induction and proliferation of protocorm-like bodies and bulblets from bulb-scale culture of *Fritillaria huphensis* (Hsiao et K.C.Hsia). Journal Agricultural Association of China 2, 414-422

- Yariv J, Rapport MM, Graf L** (1962) The interaction of glycosides and saccarides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochemical Journal* 85, 383-388.
- Yariv J, Lis H, Katchalski E** (1967) Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. *Biochemical Journal* 105, 1.
- Yu SC, Xiao PG** (1992) The existence of isosteroidal alkaloids in *Fritillaria* L. (*Liliaceae*) and its taxonomical significance. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 30, 450-459
- Yuan Y, Lin HH, Wang WJ, Li P** (2005) Callus induction and plant regeneration from bulbs of *Fritillaria thunbergii*. *Journal of Southwest Jiaotong University* 40, 281-284
- Xu Y, Zhu S** (1998) Comparison of embryoid induction condition of Siberian fritillary and ussuri fritillary. *Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition)* 26, 123-124
- Xue JP, Zhang AM, Geng ML, Ma L** (2008) Study on bulblet induction of *Fritillaria anhuiensis in vitro*. *China Journal of Chinese Materia Medica* 33, 2603-2606
- Zagorchev L, Petrova S, Odjakova M** (2008) Arabinogalactan proteins in salt-adapted suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. *General and Applied Plant Physiology* 34, 159-168
- Zavattieri MA, Frederico AM, Lima M, Sabino R, Arnhold-Schmitt B** (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reaction. *Electronic Journal of Biotechnology* 13, 1-13
- Zemah H, Bendel P, Rabinowitch H, Kamenetsky R** (1999) Visualization of morphological structure and water status during storage of *Allium aflatunenese* bulbs by NMR imaging. *Plant Science* 147, 65-73
- Zhang JX, Gui SP, Li JM, Wei JK, Kirkham MB** (1995) Protoplasmic factors, antioxidant responses and chilling resistance in maize. *Plant Physiology and Biochemistry* 33, 567-575
- Zhao GF, Cao Y, Wu Y, Fan F, Zhou LJ, Yang WH** (1983) Callus induction and organ regeneration in tissue culture of *Fritillaria ussuirensis* Maxim. *Chinese Bulletin of Botany* 1, 40-41

- Zhang L, Hytteborn H** (1985) Effect of ground water regime on development and distribution of *Fritillaria meleagris*. *Holarctic Ecology* 8, 237-244
- Zhou SB, Wang Y, Li JH, Wang CJ, Yu BQ** (2007) Morphology of leaf epidermis of *Fritillaria* in Anhui province. *China Journal of Chinese Materia Medica* 32, 105-109
- Zhong J, Ren YJ, Yu M, Ma TF, Zhang XL, Zhao J** (2011) Roles of arabinogalactan proteins in cotyledon formation and cell wall deposition during embryo development of *Arabidopsis*. *Protoplasma* 248, 551-563
- Zhu SY, Hu ZH, Yu WQ** (1980) Study on the annual periodicity of growth and development of *Fritillaria pallidiflora* Schrenk. *Journal of Integrative Plant Biology* 22, 22-26
- Zimmerman JL** (1993) Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher plants. *The Plant Cell* 5, 1411-1423
- 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
- Ziv M, Lilien-Kipins HL** (2000) Bud regeneration from inflorescence explant for rapid propagation of geophytes *in vitro*. *Plant Cell Report* 19, 845-850

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Marija P. Petrić (rođena Nikolić) rođena je 23. februara 1980. godine u Valjevu gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija, upisala je 1998. godine. Fakultet je završila 2003. godine i iste godine upisuje poslediplomske studije na smeru Fiziologija biljaka Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Doktorske studije upisuje 2006. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu u okviru studijskog programa Fiziologija i molekularna biologija biljaka.

Od 2004. do 2006. godine bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Od marta 2006. godine Marija Petrić zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za fiziologiju biljaka IBISS-a. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 2008. godine. Tokom istraživačkog rada bila je angažovana na tri nacionalna projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije i koautor je u preko 40 bibliografskih jedinica. Od 2011. godine učestvuje u realizaciji dva nacionalna projekta finansirana od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije (ON173015 i TR31019) kao i jednog međunarodnog bilateralnog projekta između Republike Srbije i Republike Hrvatske.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана _____ Марија Петрић _____
број уписа _____ ЕА060013 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Физиолошки и биохемијски аспекти регенерације коштуце (*Fritillaria meleagris* L.)

in vitro

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

Потпис докторанда

У Београду, _____ 21.05.2012. _____

Марија Петрић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Марија Петрић _____
Број уписа _____ ЕА060013 _____
Студијски програм _____ Физиологија и молекуларна биологија биљака _____
Наслов рада _____ Физиолошки и биохемијски аспекти регенерације кошутнице
(*Fritillaria meleagris* L.) *in vitro* _____
Ментор _____ др Ангелина Суботић _____

Потписана _____ Марија Петрић _____

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, _____ 21.05.2012 _____

Марија Петрић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Физиолошки и биохемијски аспекти регенерације кошутнице (*Fritillaria meleagris* L.)
in vitro

која је моје ауторско дело.

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

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

- 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, _____ 21.05.2012 _____

Марија Јешић

1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.