

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Tatjana M. Ćosić

**CITOKININSKA HOMEOSTAZA I  
EKSPRESIJA GENA UKLJUČENIH U  
KONTROLU ĆELIJSKOG CIKLUSA  
TOKOM PROCESA REGENERACIJE  
KELERABE (*Brassica oleracea* L. var.  
*gongylodes*) *IN VITRO***

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Tatjana M. Ćosić

**CYTOKININ HOMEOSTASIS AND  
EXPRESSION OF THE GENES  
INVOLVED IN CELL CYCLE CONTROL  
DURING KOHLRABI (*Brassica oleracea*  
L. var. *gongylodes*) REGENERATION  
*IN VITRO***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Mentori:

---

**Naučni savetnik dr Slavica Ninković**  
Univerzitet u Beogradu  
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

---

**Vanredni profesor dr Ivana Dragičević**  
Univerzitet u Beogradu  
Biološki fakultet

Član komisije:

---

**Redovni profesor dr Svetlana Radović**  
Univerzitet u Beogradu  
Biološki fakultet

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

“Bolje je verovati nego ne verovati.  
Ako tako činimo, dovodimo sve stvari u domen mogućeg.”

Albert Einstein (1879-1955)

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja “Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu.*

*Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru dr Slavici Ninković pre svega na optimizmu i podršci koju mi je pružala tokom svih ovih godina zajedničke saradnje. Svojim neprocenjivim savetima, razumevanjem i strpljenjem pomogla mi je da prevaziđem sve prepreke tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Iskreno se zahvaljujem dr Ivani Dragičević na korisnim savetima, odgovornom i predanom uobličavanju ove doktorske disertacije, kao i na angažovanju na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.*

*Dr Svetlani Radović srdačno hvala na izuzetno korisnim sugestijama i pomoći prilikom pisanja ove disertacije.*

*Svom šefu, dr Branki Vinterhalter, dugujem veliku zahvalnost na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da učestvujem u istraživanjima u okviru projekta čiji je rukovodilac. Takođe, zahvaljujem joj se na angažovanju oko histocitoloških istraživanja i pomoći u tumačenju rezultata.*

*Deo istraživanja ove disertacije koji se tiče analize endogenih biljnih hormona urađen je na Institutu za eksperimentalnu botaniku Češke akademije nauka u Pragu. Ovu saradnju omogućio je dr Václav Motyka kome ovom prilikom želim posebno da se zahvalim.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj najdražoj kolegici i cimerki dr Jeleni Savić koja me je naučila tehnikama qPCR analize, i pružila mi dragocenu pomoć u analizi ekspresije gena i tumačenju rezultata iz ovog dela mog rada. Takođe, njena podrška i korisni saveti bili su mi od neprocenjive vrednosti tokom svih faza izrade disertacije.*

*Posebno sam zahvalna svom dragom kolegi dr Martinu Rasporu na nesebičnoj pomoći prilikom savladavanja PCR i RT-PCR analiza koje su primenjene u ovoj disertaciji, kao i na značajnim savetima vezanim za hormonalnu regulaciju rastenja i razvića biljaka.*

*Veliko hvala dr Aleksandru Cingelu na pomoći u rešavanju brojnih praktičnih problema u svakodnevnom radu u laboratoriji.*

*Hvala dr Borutu Bohanecu na saradnji u delu ove disertacije koji se tiče citogenetičkih istraživanja.*

*Dr Snežani Zdravković-Korać se zahvaljujem na stručnoj pomoći oko molekularno-bioloških metoda, a Jeleni Milojević na pomoći oko statističke analize dobijenih rezultata.*

*Koleginicama dr Slavici Dmitrović i dr Dragani Božić se zahvaljujem na pomoći oko dela istraživanja ove disertacije koji se tiče analize ekspresije gena ćelijskog ciklusa.*

*Nadi Ćosić i Nabilu Ghalawenji se zahvaljujem na predusretljivosti, kolegijalnoj i drugarskoj pomoći.*

*Iskrenu zahvalnost upućujem dr Radomirki Nikolić na ljubaznosti, nesebičnoj podršci i savetima kojima je obogatila znatan period izrade ove disertacije.*

*Hvala i svim mojim dragim koleginicama i kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka na uvek vedroj atmosferi, izuzetnoj kolegijalnosti, srdačnosti i pruženoj pomoći u svakodnevnom radu.*

*Zahvaljujem se od srca svim mojim prijateljima koji su bili uz mene u dobrim i lošim trenucima i pružali mi moralnu podršku i pomoć kad god mi je bila potrebna.*

*Veliko hvala mom dragom prijatelju i kumu dr Ivanu Jančiću na pregledu doktorske disertacije i korisnim sugestijama.*

*Mojim divnim roditeljima, Vesni i Miletu, kao i bratu Nebojši, beskrajno hvala na ljubavi, podršci i nesebičnoj pomoći koju su mi pružali tokom čitavog života.*

*Na kraju, želela bih da izrazim svoju najdublju zahvalnost ćerki Isidori i suprugu Urošu, kojima i posvećujem ovaj rad. Hvala vam na безусловnoj ljubavi, neizmernoj radosti i beskrajnom strpljenju.*

## **Citokininska homeostaza i ekspresija gena uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa tokom procesa regeneracije kelerabe (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes*) *in vitro***

### **REZIME**

Regeneracija *in vitro* gajenog biljnog tkiva kontrolisana je regulatorima rastenja, naročito citokininima i auksinima. Egzogeno primenjeni biljni regulatori rastenja mogu interagovati sa endogenim biljnim hormonima i uticati na njihovu biosintezu ili distribuciju, odnosno menjati hormonalnu homeostazu koja utiče na razviće *in vitro*. Proces regeneracije biljaka *in vitro* podrazumeva intenzivne ćelijske deobe, a centralnu ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa i razvića organa imaju kompleksi ciklina i kinaza zavisnih od ciklina na čiju sintezu, odnosno aktivnost, utiču pomenuti biljni hormoni. U tom smislu, ciljevi ovog rada bili su uspostavljanje efikasnih protokola za regeneraciju biljaka kelerabe (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes*) *in vitro*, sa posebnim osvrtom na identifikaciju i kvantifikaciju različitih grupa citokinina i indol-3-sirćetne kiseline (IAA) u eksplantatskim tkivima sa regenerisanim izdancima, kao i analiziranje obrazaca i intenziteta ekspresije gena koji kodiraju cikline i kinaze zavisne od ciklina tokom *de novo* organogeneze izdanaka. Efikasan sistem za repetitivnu somatsku embriogenezu (SE) kod kelerabe, sorta Bečka Plava (BP), je uspostavljen iz nezrelih zigotskih embriona. Najveća frekvencija SE detektovana je kod nezrelih zigotskih embriona u ranom kotiledonarnom stadijumu razvića gajenih na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja.

Uspešna indukcija *de novo* organogeneze izdanaka kelerabe, sorte BP i Bečka Bela (BB), postignuta je kod odsečaka hipokotila i intaktnih klijanaca, na podlogama sa pojedinačnim citokininima (CK): 6-benzilaminopurin (BAP), tidiazuron (TDZ), *trans*-zeatin (*transZ*) ili *cis*-zeatin (*cisZ*). Frekvencija regeneracije kao i vijabilnost regenerisanih izdanaka obe sorte je bila veća kod intaktnih klijanaca, dok su među primenjenim citokininima BAP i TDZ bili najefikasniji u indukciji *de novo* organogeneze. Kvantifikacija endogenog sadržaja citokinina i IAA u odseccima hipokotila sa regenerisanim izdancima (HRI) kao i u intaktnim klijanacima sa regenerisanim izdancima (KRI) je ukazala na to da uočene razlike u organogenom odgovoru ova dva tipa početnog biljnog materijala mogu biti povezane sa njihovim hormonskim statusom. Nivo ukupnih endogenih citokinina je bio viši kod HRI, dok su

se KRI odlikovali višim odnosom IAA i bioaktivnih citokinina. Izraziti porast nivoa endogenih citokinina u odnosu na kontrolu koja je gajena na podlozi bez regulatora rastenja zabeležen je na tretmanima sa zeatinom, dok je prisustvo BAP i TDZ imalo mali efekat ili je efekat potpuno izostao. U poređenju sa kontrolom, egzogena primena citokinina dovela je do porasta endogenog nivoa IAA i u HRI i u KRI kod obe sorte kelerabe, čime se verovatno može objasniti odsustvo potrebe za auksinima u hranljivim podlogama tokom indukcije *de novo* organogeneze izdanaka.

Dinamiku pojave regenerisanih izdanaka kelerabe na različitim citokininskim tretmanima je pratio i nivo aktivnosti tri analizirana gena koji kodiraju kinaze zavisne od ciklina (CDK) i cikline (CYC): *CDKB2;1*, *CYCB2;4* i *CYCH;1* gen. Obrasci ekspresije sva tri gena u odnosu na vreme i različite tretmane su bili slični, sa najvišim vrednostima zabeleženim na podlozi sa TDZ u skoro svim vremenskim tačkama. Dobijeni rezultati ukazuju na to da su primenjeni citokinini imali ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa tako što su uticali na ekspresiju pomenutih gena, kao i da je promena aktivnosti tih gena bila u korelaciji sa određenim fazama *de novo* organogeneze izdanaka kelerabe. Iako razjašnjenje uloge citokinina u procesu regeneracije izdanaka kelerabe zahteva dodatna istraživanja, dobijeni rezultati predstavljaju polaznu osnovu za dalje rasvetljavanje mehanizama *de novo* organogeneze kod biljaka koje nisu uobičajeni model-sistemi za izučavanje procesa regeneracije *in vitro*.

**Ključne reči:** Keleraba (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes*), nezreli zigotski embrioni, somatska embriogeneza, hipokotil, klijanac, *de novo* organogeneza, citokinini, geni ćelijskog ciklusa, ciklini, kinaze zavisne od ciklina

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija i molekularna biologija biljaka

**UDK broj:** 577.21:581.1:633.425(043.3)

**Cytokinin homeostasis and expression of the genes involved in cell cycle control during kohlrabi (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes*) regeneration *in vitro***

**ABSTRACT**

*In vitro* plant regeneration is under control of plant growth regulators (PGRs), especially cytokinins and auxins. Exogenously applied PGRs can affect the homeostasis of endogenous plant hormones by influencing their biosynthesis and distribution, subsequently altering *in vitro* development. Intensive cell divisions represent the basis of *in vitro* plant regeneration, and they are controlled by complexes of cyclins and cyclin-dependent kinases. The activity of these complexes during cell cycle and organ development is affected by plant hormones. Respecting this, the aims of this study were developing efficient protocols for *in vitro* regeneration of kohlrabi (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes*) with an emphasis on identification and quantification of different groups of endogenous cytokinins and indole-3-acetic acid (IAA) in explant tissue with respective regenerated shoots, as well as analyzing expression of genes encoding cyclins and and cyclin-dependent kinases during *de novo* shoot organogenesis. Efficient system for repetitive somatic embryogenesis (SE) was developed for kohlrabi cv. Vienna Purple (VP) using immature zygotic embryos. The highest frequency of SE was obtained from immature zygotic embryos at the early cotyledonary stage grown on PGR-free medium.

Successful induction of *de novo* shoot organogenesis in kohlrabi cv VP and cv. Vienna White (VW) was achieved using hypocotyl explants and intact seedlings, cultivated on media supplemented with single cytokinin (CK): 6-benzylaminopurine (BAP), thidiazuron (TDZ), *trans*-zeatin (*transZ*) or *cis*-zeatin (*cisZ*). Higher frequency of shoot regeneration as well as viability of regenerated shoots was detected for intact seedlings, with BAP and TDZ being the most efficient in *de novo* organogenesis induction. Quantification of endogenous cytokinin and IAA contents in both hypocotyl explants and seedlings with regenerated shoots (HRSs and SRSs, respectively) suggested that the observed differences in organogenic response between these two types of starting plant material were related to their cytokinin and IAA contents. The level of total CKs was higher in HRSs, while SRSs displayed a higher IAA/bioactive CKs ratio. Significant



increase in the endogenous CK levels compared to control grown on PGR-free medium was recorded only when *cis*- and *trans*Z were applied, while presence of BAP and TDZ in the shoot regeneration media contributed to little or no increase. Compared to control, exogenous addition of CKs to the regeneration media contributed to an increase in endogenous levels of IAA in both HRSs and SRSs of both cultivars indicating that elevated IAA levels could be sufficient to induce *de novo* organogenesis without exogenously applied auxins.

The dynamics of regenerated shoots development were accompanied by expression of the three analyzed genes encoding cyclin-dependent kinases (CDKs) and cyclins (CYC): *CDKB2;1*, *CYCB2;4* and *CYCH;1* gene. Expression patterns of all three genes in terms of time and different treatments were similar, with the highest values recorded on TDZ treatment in almost all time points. Our results suggested the role of applied CKs in cell cycle control by influencing the expression of analyzed genes, and that the changes in activity of these genes was correlated with distinct phases of *de novo* shoot organogenesis in kohlrabi. Although clarification of cytokinin role in regeneration of kohlrabi shoots requires additional research, these results present useful background for further investigation of mechanisms involved in *de novo* organogenesis in plants that do not represent common model systems for *in vitro* regeneration study.

**Key words:** Kohlrabi (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes*), immature zygotic embryos, somatic embryogenesis, hypocotyl, seedling, *de novo* organogenesis, cytokinins, cell cycle genes, cyclins, cyclin-dependent kinases

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Plant physiology and molecular biology

**UDC number:** 577.21:581.1:633.425(043.3)

# SADRŽAJ

strana

## SKRAĆENICE

<b>1.</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Opšte karakteristike vrste <i>Brassica oleracea</i> L.</b>	<b>1</b>
1.1.1.	Keleraba ( <i>B. oleracea</i> L.var. <i>gongylodes</i> )	2
<b>1.2.</b>	<b>Morfogeneza biljaka <i>in vitro</i></b>	<b>5</b>
1.2.1.	Somatska embriogeneza	5
1.2.1.1.	Poreklo somatskih embriona	7
1.2.1.2.	Indukcija somatske embriogeneze	9
1.2.1.3.	Razviće somatskih embriona	10
1.2.1.4.	Očuvanje embriogenog potencijala tokom vremena	12
1.2.2.	<i>De novo</i> organogeneza	12
1.2.2.1.	Predloženi model razvića organa tokom <i>de novo</i> organogeneze	13
1.2.2.2.	Uloga biljnih regulatora rastjenja u procesu <i>de novo</i> organogeneze	14
1.2.2.3.	Molekularni aspekt <i>de novo</i> organogeneze	16
1.2.2.4.	Značaj <i>de novo</i> organogeneze	20
1.2.3.	Regeneracija biljaka kelerabe <i>in vitro</i>	20
<b>1.3.</b>	<b>Citokinini</b>	<b>22</b>
1.3.1.	Struktura citokinina	22
1.3.2.	Konjugovani oblici citokinina	25
1.3.3.	Biosinteza citokinina	27
1.3.4.	Katabolizam citokinina	30
1.3.5.	Regulacija metabolizma citokinina	31
1.3.6.	Specifični fiziološki efekti citokinina	33
<b>1.4.</b>	<b>Ćelijski ciklus</b>	<b>35</b>
1.4.1.	Ciklini i kinaze zavisne od ciklina	36
1.4.2.	Hormonalna regulacija ćelijskog ciklusa	39
<b>2.</b>	<b>CILJEVI RADA</b>	<b>42</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b>	<b>43</b>
<b>3.1.</b>	<b>Početni biljni materijal</b>	<b>43</b>
3.1.1.	Somatska embriogeneza	43
3.1.2.	<i>De novo</i> organogeneza izdanaka	44
<b>3.2.</b>	<b>Hranljiva podloga</b>	<b>44</b>
<b>3.3.</b>	<b>Gajenje u uslovima <i>in vitro</i></b>	<b>46</b>
<b>3.4.</b>	<b>Indukcija somatske embriogeneze iz nezrelih zigotskih embriona <i>in vitro</i></b>	<b>47</b>
3.4.1.	Efekat citokinina na formiranje sekundarnih embriona	47

3.4.2.	Regeneracija biljaka iz somatskih embriona i njihova aklimatizacija u uslovima staklene bašte	48
<b>3.5.</b>	<b>Regeneracija kelerabe putem <i>de novo</i> organogeneze</b>	48
3.5.1.	Umnožavanje regenerisanih izdanaka	49
3.5.2.	Ožiljavanje izdanaka i aklimatizacija biljaka u uslovima staklene bašte	49
<b>3.6.</b>	<b>Analiza endogenih biljnih hormona</b>	49
<b>3.7.</b>	<b>Histološka analiza</b>	51
<b>3.8.</b>	<b>Analiza ploidnosti regenerisanih biljaka</b>	53
<b>3.9.</b>	<b>Analiza ekspresije gena uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa</b>	53
3.9.1.	Izolacija ukupne RNK	54
3.9.2.	Provera kvaliteta i kvantifikacija izolovane RNK	55
3.9.3.	Prečišćavanje uzoraka RNK od kontaminacije sa DNK	55
3.9.4.	Reverzna transkripcija (RT)	56
3.9.5.	PCR reakcija	57
3.9.6.	Standardi za apsolutnu kvantifikaciju ekspresije gena	59
3.9.7.	Kvantitativna PCR reakcija (qPCR)	60
3.9.8.	Analiza podataka u qRT-PCR metodi	61
<b>3.10.</b>	<b>Statistička obrada podataka i grafičko predstavljanje rezultata</b>	61
3.10.1.	Indukcija somatske embriogeneze	62
3.10.2.	Regeneracija kelerabe putem <i>de novo</i> organogeneze	62
3.10.3.	Analiza ekspresije gena uključenih u ćelijski ciklus	63
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b>	64
<b>4.1.</b>	<b>Somatska embriogeneza</b>	64
4.1.1.	Formiranje somatskih embriona	64
4.1.2.	Sekundarna somatska embriogeneza	69
4.1.3.	Efekat citokinina na formiranje sekundarnih embriona	71
4.1.4.	Histološka analiza	73
4.1.5.	Aklimatizacija i analiza ploidnosti regenerisanih biljaka	75
<b>4.2.</b>	<b>Regeneracija biljaka kelerabe putem organogeneze</b>	76
4.2.1.	Regeneracija iz odsečaka korena i kotiledona	77
4.2.2.	Regeneracija iz odsečaka hipokotila i intaktnih klijanaca	78
4.2.3.	Histološka analiza <i>de novo</i> formiranih pupoljaka kod klijanaca kelerabe tretiranih citokininima	82
4.2.4.	Efekat podloge za regeneraciju na stepen umnožavanja regenerisanih izdanaka	84
4.2.5.	Ožiljavanje regenerisanih izdanaka	86
4.2.6.	Analiza aklimatizovanih biljaka protočnom citometrijom	88
<b>4.3.</b>	<b>Analiza endogenih biljnih hormona</b>	89
4.3.1.	Sadržaj endogenih citokinina	89
4.3.2.	Endogeni sadržaj IAA i odnos IAA / bioaktivne forme citokinina	97
<b>4.4.</b>	<b>Određivanje nivoa ekspresije gena uključenih u ćelijski ciklus kelerabe tokom procesa organogeneze <i>in vitro</i></b>	100

<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA</b>	109
<b>5.1.</b>	<b>Somatska embriogeneza</b>	109
<b>5.2.</b>	<b><i>De novo</i> organogeneza</b>	114
	5.2.1. Efekat tipa eksplantata na efikasnost regeneracije izdanaka	115
	5.2.2. Efekat egzogeno primenjenih citokinina na regeneraciju izdanaka	116
	5.2.3. Efekat citokininskih pretretmana na umnožavanje izdanaka dobijenih <i>de novo</i> organogenezom	118
	5.2.4. Ožiljavanje i aklimatizacija umnoženih izdanaka regenerisanih iz klijanaca	118
<b>5.3.</b>	<b>Endogeni nivo citokinina i IAA</b>	119
	5.3.1. Nivo endogenih citokinina i IAA u eksplantatima sa regenerisanim izdancima gajenim na različitim hranljivim podlogama za regeneraciju	119
	5.3.2. Endogeni sadržaj citokinina i IAA kao mogući faktor koji utiče na efikasnost regeneracije	123
<b>5.4.</b>	<b>Ekspresija gena uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa tokom <i>de novo</i> organogeneze izdanaka</b>	125
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b>	130
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b>	133
	<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b>	171
	<b>Prilog 1</b> – Izjava o autorstvu	
	<b>Prilog 2</b> – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije	
	<b>Prilog 3</b> – Izjava o korišćenju	

## SKRAĆENICE

ABA	abscisinska kiselina
ADP	adenozin difosfat
AMP	adenozin monofosfat
ANOVA	analiza varijanse
ATP	adenozin trifosfat
BAP	<i>N</i> <sup>6</sup> -benzilaminopurin
BB	sorta Bečka Bela
BP	sorta Bečka Plava
CAK	CDK-aktivirajuća kinaza
CDK	kinaza zavisna od ciklina
cDNK	komplementarni lanac DNK
CIM	hranljiva podloga za indukciju kalusa
CK	citokinin
CKX	enzim citokinin oksidaza/dehidrogenaza
CCCP	karbonil cijanid <i>m</i> -hlorofenil hidrazon
CPPU	<i>N</i> -fenil- <i>N'</i> -(2-hloro-4-piridil)-urea
CTAB	heksadecil-3-metil-amonijum-bromid
CYC	ciklin
CYP735A	enzim membranska monooksigenaza
<i>cisZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZ7G</i>	<i>cis</i> -zeatin 7-glukozid
<i>cZ9G</i>	<i>cis</i> -zeatin 9-glukozid
<i>cZOG</i>	<i>cis</i> -zeatin <i>O</i> -glukozid
<i>cZ9R</i>	<i>cis</i> -zeatin 9-ribozid
<i>cZ(9)RMP</i>	<i>cis</i> -zeatin 9-ribozid-5'-monofosfat
<i>cZ9ROG</i>	<i>cis</i> -zeatin 9-ribozid <i>O</i> -glukozid
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DEPC	dietil dikarbonat
DFU	difenilurea

DHZ	dihidrozeatin
DHZ7G	dihidrozeatin 7-glukozid
DHZ9G	dihidrozeatin 9-glukozid
DHZOG	dihidrozeatin <i>O</i> -glukozid
DHZ9R	dihidrozeatin 9-ribozid
DHZ(9)RMP	dihidrozeatin 9-ribozid-5'-monofosfat
DHZ9ROG	dihidrozeatin 9-ribozid <i>O</i> -glukozid
2,4-D	2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina
DMAPP	dimetilalil difosfat
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamin-tetrasirćetna kiselina
FAD	kofaktor flavin adenin dinukleotid
GA <sub>3</sub>	giberelna kiselina
HRI	hipokotil sa regenerisanim izdancima
HMBDP	hidroksimetilbutenil difosfat
(2D)-HPLC	(dvodimenzionalna) tečna hromatografija pod visokim pritiskom
IAA	indol-3-sirćetna kiselina
IBA	indol-3-buterna kiselina
iP	<i>N</i> <sup>6</sup> -( $\Delta^2$ -izopentenil) adenin
iP7G	<i>N</i> <sup>6</sup> -( $\Delta^2$ -izopentenil) adenin 7-glukozid
iP9G	<i>N</i> <sup>6</sup> -( $\Delta^2$ -izopentenil) adenin 9-glukozid
iP9R	<i>N</i> <sup>6</sup> -( $\Delta^2$ -izopentenil) adenin 9-ribozid
iPRDP	<i>N</i> <sup>6</sup> -2-izopentenil adenin 9-ribozid-5'-difosfat
iP(9)RMP	<i>N</i> <sup>6</sup> -2-izopentenil adenin 9-ribozid-5'-monofosfat
iPRTP	<i>N</i> <sup>6</sup> -2-izopentenil adenin 9-ribozid-5'-trifosfat
IPT	enzim izopentenil transferaza
iRNK	informaciona RNK
KRI	klijanac sa regenerisanim izdancima
LOG	enzim monofosfat fosforibohidrolaza
LSD	eng. “ <i>Least Significant Difference</i> “ – najmanja statistički značajna razlika
MEP	metileritritol fosfat
MS	masena spektrometrija; Murashige i Skoog hranljiva podloga

MVA	mevalonska kiselina
NAA	$\alpha$ -naftil-sirćetna kiselina
PCR	eng. “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> “ – lančana reakcija polimeraze
pRb	retinoblastoma protein
PVP	polivinil-pirolidon
q(RT-)PCR	kvantitativni (RT-)PCR
RNK	ribonukleinska kiselina
RT	reverzna transkripcija
SE	somatska embriogeneza
S.E.	eng. “ <i>Standard Error</i> “ – standardna greška
SIM	hranljiva podloga za regeneraciju izdanaka
TBE	tris-boratni-EDTA pufer
T-DNK	deo plazmidne DNK koji se integriše u biljni genom
TDZ	tiazuron
Thr	treonin
TRIS	tris-hidroksimetil aminometan
tRNK	transportna RNK
tRNK-IPT	enzim tRNK izopentil transferaza
<i>transZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
Tyr	tirozin
<i>tZ7G</i>	<i>trans</i> -zeatin 7-glukozid
<i>tZ9G</i>	<i>trans</i> -zeatin 9-glukozid
<i>tZOG</i>	<i>trans</i> -zeatin <i>O</i> -glukozid
<i>tZ9R</i>	<i>trans</i> -zeatin 9-ribozid
<i>tZ(9)RMP</i>	<i>trans</i> -zeatin 9-ribozid-5'-monofosfat
<i>tZ9ROG</i>	<i>trans</i> -zeatin 9-ribozid <i>O</i> -glukozid
<i>tZRDP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribonukleotid difosfat
<i>tZRMP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribonukleotid monofosfat

## 1. UVOD

### 1.1. Opšte karakteristike vrste *Brassica oleracea* L.

Vrsta *B. oleracea* L. pripada rodu *Brassica*, familija *Brassicaceae*, i obuhvata dvogodišnje ili višegodišnje biljke, različitih morfologija, koje jednu ili više godina razvijaju vegetativne organe pre nego što počnu da cvetaju. Divlji tipovi *B. oleracea* L. se mogu naći na obalama severne Španije, zapadne Francuske i južne i jugozapadne Engleske (Rakow 2004). Kultivisani pripadnici ove vrste se danas gaje širom sveta i predstavljaju važne povrtarske kulture u mnogim zemljama, a smatra se da vode poreklo od zapadnoevropskog divljeg tipa (Rakow 2004). Ova vrsta obuhvata više podvrsta kao što su kupus, kelj, prokelj, karfiol, brokoli, raštan i keleraba.

Povrtarske kulture vrste *B. oleracea* L., poznate još kao kupusnjače, se karakterišu niskim sadržajem masnoća i visokim sadržajem vitamina, minerala i vlakana. To je dovelo do rasprostranjene upotrebe ovih biljaka u svakodnevnoj ishrani ljudi, kao i u stočnoj ishrani širom sveta (Cardoza i Stewart 2004; Kapusta-Duch i sar. 2012).

Povrtarske kupusnjače se ne koriste samo zbog hranljivih vrednosti koje poseduju već i zbog njihovih lekovitih svojstava (Ishida i sar. 2014). Korisni i blagotvorni efekti ove grupe biljaka na zdravlje čoveka povezani su sa sadržajem određenih hemijskih jedinjenja koja sprečavaju oksidativni stres, indukuju enzime za detoksikaciju, stimulišu imunski sistem, umanjuju rizik od kancera, inhibiraju kancerogene mutacije i redukuju razmnožavanje ćelija kancera (Kapusta-Duch i sar. 2012). Usled prisustva vitamina C i E,  $\beta$ -karotena, kalcijuma, luteina, zeaksantina i antioksidativnih enzima kao što su katalaze, superoksid dismutaze i peroksidaze, povrtarske kupusnjače predstavljaju značajan izvor antioksidanasa (Choi i sar. 2010; Kapusta-Duch i sar. 2012).

Takođe, ove biljke su važan izvor fenolnih jedinjenja (Harbaum i sar. 2007) i glukozinolata, kao što je glukobrasicin (Hayes i sar. 2008). Glukozinolati su sekundarni metaboliti biljaka a njihov sadržaj se razlikuje između biljnih vrsta pa i organa (Rosa i



sar. 1997). Njihovom hidrolizom pomoću enzima mirozinaze, prisutnog u biljnim tkivima, nastaju izotiocijanati, nitrili, epitionitrili i gitrin (Bones i Rossiter 1996; 2006). Ova jedinjenja su nosioci ukusa i mirisa kupusnjača (Williams i Pun 2011) i prisutni su u visokim količinama u jestivim delovima ovih biljaka (Choi i sar. 2010). Degradacioni proizvodi glukozinolata, a posebno izotiocijanati, biološki su aktivni (Vaughn i Berhow 2005). Pokazano je da su neka od ovih jedinjenja toksična za korove, patogene i štetočine iz zemljišta, kao što su bakterije, nematode, insekti i gljive (Gardiner i sar. 1999; Petersen i sar. 2001).

Sa druge strane, mnogi glukozinolati odnosno izotiocijanati prisutni u ovim biljkama su poznati po visokoj antikancerogenoj aktivnosti (Fahey i sar. 2001; Gamet i sar. 2000). Takođe, povrtarske kupusnjače su bogate sulforafanom i indol-3-karbinolom koji mogu inhibirati metilaciju molekula DNK i razvoj kancera (Kapusta-Duch i sar. 2012). Zbog svega navedenog, često konzumiranje ovih biljaka može dovesti do smanjenja rizika od kancerogeneze i određenih bolesti kod ljudi (Fahey i sar. 2013).

### **1.1.1. Keleraba (*B. oleracea* L. var. *gongylodes*)**

Keleraba (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes*) je niska dvogodišnja biljka koja dostiže visinu do 40 cm u zreлом vegetativnom stadijumu (**Slika 1**). Ime je dobila od nemačkih reči “Kohl“ što znači kupus i “Rübe/Rabi“ što znači repa, jer podseća na ove biljke. Odlikuje se nerazgranatim stablom koje počinje da zadebljava između trećeg i petog nodusa u prvoj godini života, nakon formiranja četvrtog ili sedmog pravog lista (Selman i Kulasegaram 1966). Listovi romboidnog oblika i više ili manje urezane ivice su spiralno raspoređeni na dugim peteljicama. Listovi se protežu direktno iz zadebljalog stabla i na vrhu čine rozetu, dok na donjem delu zadebljanja dolazi do njihove apscisije nakon koje ostaju beli lisni ožiljci (Selman i Kulasegaram 1966). Ovo jestivo zadebljanje, koje se još naziva i krtola stabla, do dostizanja tehnološke zrelosti poprima okruglast, okruglasto spljošten ili ovalan oblik prečnika do 12 cm. Krtole postaju drvenastije i fibroznije sa starenjem. Do formiranja dvoplanih cvetova žućkaste boje dolazi u drugoj godini (<http://www.semena.org/agro/Kapusta%20kohlrabi1-e.htm>). Za kelerabu je, kao i za druge pripadnike roda *Brassica*, karakteristično unakrsno oprašivanje koje se odvija uz pomoć insekata (Navazio 2012).

Prvi podaci o ovoj biljci datiraju još iz 16. veka. Smatra se da je prirodna postojbina kelerabe severozapadna Evropa. Pored Evrope, Severne Amerike i delova Azije sa umerenom klimom, keleraba se danas gaji i u suptropskim regionima Azije kao što su Indija, Kina, severni Vijetnam i Koreja (Choi i sar. 2010). Postoje različite sorte kelerabe, a zavisno od sorte, stablo kelerabe može biti bele, ljubičaste ili zelene boje, pri čemu je unutrašnjost krtole uvek bele boje (Escalona i sar. 2007). Zelene sorte se obično gaje kao prolećni i letnji usevi, a ljubičaste sorte koje su otpornije na niže temperature, kao jesenji i zimski usevi.

Keleraba, kao i druge povrtarske kupusnjače, ima veliku nutritivnu i lekovitu vrednost usled visokog sadržaja vlakana, vitamina C i drugih vitamina (A, B1, B2, B5, B6 i E), minerala (K, Ca, Mg, Zn i Fe) i antioksidativnih supstanci koje sprečavaju stvaranje faktora koji izazivaju kancer (Hassan i sar. 2011), i generalno imaju ulogu u očuvanju zdravlja čoveka. Upravo iz navedenih razloga, ova biljka je u skorije vreme postala popularna i sve više se koristi u ljudskoj ishrani, ali i u ishrani stoke.



**Slika 1.** Keleraba, sorta Bečka Plava, gajena u polju (*Preuzeto sa <http://www.tohumlar.net/mor-kohlrabi-yer-lahanasi-purple-vienna-pmu1029>*).

Krtola kelerabe je bogata skrobom i redukujućim šećerima (Selman i Kulasegaram 1966). Sastav redukujućih šećera kelerabe iznosi oko 21 mg g<sup>-1</sup> sveže mase (Choi i sar. 2010). Glavni šećeri u stablu jesu fruktoza, glukoza i saharoza

(Escalona i sar. 2007). Za razliku od nekih povrtarskih kupusnjača koje se odlikuju gorkim ukusom, keleraba ima sočan i slatkast ukus za koji se pretpostavlja da potiče od većeg sadržaja određenih aminokiselina (Choi i sar. 2010).

Keleraba se odlikuje kratkim vegetacionim periodom, kao i većom otpornošću na niske temperature i sušu u odnosu na ostale kupusnjače. To joj omogućava da uspeva na područjima gde nije moguće uzgajanje drugih povrtarskih kupusnjača, tako da može poslužiti kao alternativa ovim kulturama (Uddin i sar. 2009). Takođe, ukus i tekstura zadebljalog dela stabla kelerabe su slični rotkvici, *Raphanus sativus* L. (Grubben i Denton 2004), pa se smatra da keleraba može služiti kao zamena za ovu biljnu vrstu, koja ima daleko veći ekonomski značaj od kelerabe. Choi i saradnici (2010) su vršili uporedne analize hranljivih, strukturnih i funkcionalnih komponenti kelerabe i rotkvice. Pokazalo se da je ukupni sadržaj slobodnih aminokiselina veći kod kelerabe kao i da sadrži više osnovnih aminokiselina, kao što su treonin i valin, što je pokazatelj da je keleraba nutritivno kvalitetnija u odnosu na rotkvicu. Dodatno, njihova istraživanja su otkrila da je glavni glukozinolat u kelerabi glukoserucin, od koga može nastati glukorafanin ili njegov izotiocijanat – sulforafanin (Iori i sar. 1999), koji je poznat po antikancerogenoj aktivnosti (Fahey i sar. 2001). Takođe, kod nekih sorti kelerabe vršena je analiza sadržaja peroksidaza koje u današnje vreme imaju ogromnu komercijalnu primenu (Shetty i sar. 2012). Rezultati datih istraživanja ukazuju da bi keleraba mogla poslužiti kao alternativni izvor ovog enzima.

Problemi na koje se nailazi tokom uzgajanja kelerabe su brojni. Najvažniji su gubitak težine, povećano otvrdnjavanje tokom zimskog skladištenja kao i razvoj bolesti (Escalona i sar. 2007). Keleraba, kao i druge podvrste *Brassica oleracea*, je veoma osetljiva na različite insekte, bakterije i gljive kao što je rizoktonija (*Rhizoctonia solani*), koja uzrokuje pojavu truleži tamno braon boje u osnovi korena, odakle se zaraza prenosi na lisne drške (Grosch i sar. 2004). Kao dodatak klasičnim tehnikama gajenja biljaka koje su već dostupne, genetičko inženjerstvo kelerabe bi moglo ponuditi nove mogućnosti u borbi protiv ovih važnih štetočina i omogućilo razvijanje varijeteta koji su otporni na bolesti. Upotreba biotehnoloških metoda kao što je genetička transformacija zahteva kao preduslov efikasan i ponovljiv sistem za *in vitro* regeneraciju. Takav sistem bi mogao da pruži i temelj za dalje istraživanje mehanizama

koji su uključeni u kontrolu debljanja stabla kao i za izučavanje interakcija biljnih hormona koje se nalaze u osnovi ovog procesa (Selman i Kulasegaram 1966).

## **1.2. Morfogeneza biljaka *in vitro***

Ključna karakteristika biljnih ćelija jeste totipotencija, tj. da njihovi nukleusi sadrže kompletnu genetičku informaciju neophodnu za formiranje čitavog organizma (Von Arnold i sar. 2002; Neelkandan i Wang 2012). Totipotencija biljnih ćelija pruža mogućnost za regeneraciju kompletnih biljaka iz izolovanih organa ili njihovih manjih fragmenata, čak i iz pojedinačnih ćelija pod određenim uslovima.

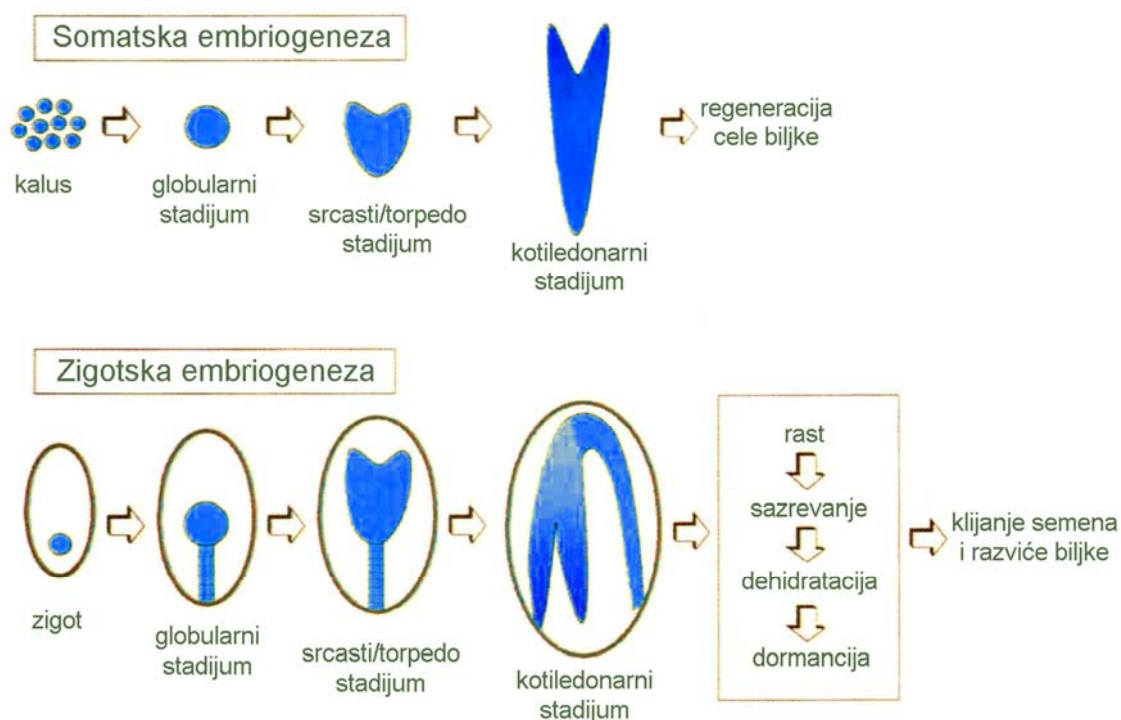
Regeneracija u kulturi biljnog tkiva *in vitro* pruža najbolji dokaz za postojanje totipotencije. Kultura biljnog tkiva podrazumeva sterilno gajenje biljnih ćelija, tkiva, organa i njihovih delova (eksplantata) pod kontrolisanim fizičkim i hemijskim uslovima *in vitro*. Na taj način se može dobiti veliki broj novih biljaka koje su genetički homogene i pripadaju istoj polnoj generaciji kao i majka biljka. Identifikacija uslova za ispoljavanje totipotencije biljnih ćelija *in vitro* je vrlo teška i još uvek je uglavnom empirijskog karaktera. Pokazano je da regeneracija biljaka *in vitro* ide preko dva glavna morfo-genetska puta: somatske embriogeneze i *de novo* organogeneze.

### **1.2.1. Somatska embriogeneza**

Somatska embriogeneza predstavlja proces u kome do formiranja morfološki normalnih embriona, preko karakterističnih embrioloških stupnjeva, dolazi bez fuzije gameta, tj. embrioni nastaju od pojedinačnih ili manjih grupa somatskih ćelija biljaka. Embrioni koji tom prilikom nastaju nazivaju se somatski embrioni i od njih se mogu razviti kompletni biljni organizmi. Somatska embriogeneza *in vivo* se po pravilu dešava kod intra-ovularnih struktura, mada je moguća pojava adventivnih embriona i na ivicama listova.

Somatska embriogeneza *in vitro* predstavlja čestu pojavu kod biljaka, i otkrivena je kod više od 100 biljnih vrsta (Thorpe 2007; Vasil 2008). Intenzivno je proučavana i korišćena kao važan put za regeneraciju celih biljaka u kulturi *in vitro*.

U procesu somatske embriogeneze, bipolarna struktura slična zigotskom embrionu se formira iz somatskih ćelija bez vaskularne veze sa tkivom majke biljke (Jiménez 2001; Von Arnold i sar. 2002; Smertenko i Bozhkov 2014). Tokom razvića somatski embrioni prolaze kroz niz uzastopnih promena, nalik onima u zigotskoj embriogenezi koja podrazumeva fuziju gameta, odnosno oplodjenje i nastanak zigota, a zatim i formiranje embriona. Uočene su velike morfološke, citološke i molekularne sličnosti između zigotske i somatske embriogeneze (Gaj 2004; Jiménez 2005), što ukazuje na slične molekularne mehanizme prisutne u oba tipa embriogeneze. U osnovi i zigotski i somatski embrion prolaze kroz iste stadijume razvića (**Slika 2**): globularni, srcasti, torpedo, kotiledonarni i zreli embrion (Zimmerman 1993).



**Slika 2.** Poređenje indirektne somatske i zigotske embriogeneze (*Modifikovano prema Zimmerman 1993*).

Bez obzira na sličnosti, somatska embriogeneza se razlikuje po nekim detaljima od zigotske. Prvo, kod somatske embriogeneze izostaje diferenciranje endosperma kao i stvaranje suspenzora. Takođe, u najvećem broju slučajeva izostaje dehidracija embriona i period dormancije. I ono što je veoma važno, kod somatske embriogeneze

neophodno je sticanje embriogene kompetentnosti somatskih ćelija pre inicijacije razvića embriona (Fehér i sar. 2003).

### **1.2.1.1. Poreklo somatskih embriona**

Somatski embrioni se formiraju od embriogenih ćelija koje nastaju od somatskih ćelija bilo eksplantata, kalusa ili ćelijske suspenzije. Bez obzira na tip eksplantata, ćelije eksplantata podležu procesu dediferencijacije i stiču meristemska svojstva (Gaj 2004). Dakle, za razliku od razvića zigotskog embriona koji počinje oplodnjem i nastankom zigota, kod somatske embriogeneze somatske ćelije moraju da poseduju, odnosno steknu embriogenu kompetenciju. Somatska embriogeneza može biti spontana, kada nije neophodno prisustvo nekog stimulusa da bi se odvijala. Tada, somatske ćelije već poseduju kapacitet za formiranje embriona, a takve ćelije se uglavnom javljaju u embrionalnom tkivu. U ostalim slučajevima dolazi do indukovane somatske embriogeneze, gde somatske ćelije stiču embriogenu kompetenciju pod uticajem određenih hemijskih i fizičkih stimulusa (Elhiti i sar. 2013). To podrazumeva reprogramiranje obrazaca ekspresije gena (Fehér i sar. 2003).

Tkiva eksplantata sadrže određeni broj ćelija koje imaju potencijal za ispoljavanje totipotentnosti, odnosno određeni kapacitet da postanu embriogene. Takve ćelije, koje predstavljaju prelazno stanje između somatskih i embriogenih ćelija, zovu se kompetentne (Gaj 2004; Elhiti i sar. 2013). Ove ćelije ispoljavaju osetljivost prema fizičkim i hemijskim stimulusima koji iniciraju embriogeni put njihovog razvića, dok su embriogene ćelije već deteminisane za embriogenezu.

Pod uticajem specifičnih signala, najčešće biljnih regulatora rastenja, dolazi do indukcije kompetentnih ćelija. To vodi izmenjenom obrascu ekspresije odnosno transkripcije gena, kao i drugačijoj morfologiji i putevima razvića (Von Arnold i sar. 2002; Elhiti i sar. 2013; Smertenko i Bozhkov 2014). Jedan od mogućih mehanizama kojima se ovo postiže jeste metilacija DNK, na koju utiču auksini (LoShiavo i sar. 1989). Smatra se da biljni regulatori rastenja kao i stresni faktori igraju centralnu ulogu u iniciranju signalne transdukcije koja vodi reprogramiranju genske ekspresije. Nakon

tretiranja kompetentnih ćelija eksplantata odgovarajućim indukcionim tretmanima, samo određeni broj ćelija stiže embriogeni kapacitet (Jiménez 2005).

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 (Pennel i sar. 1992; Fehér i sar 2002). Embriogene ćelije ulaze u novi put razvića pri čemu prvo dolazi do formiranja morfološki asimetrične strukture. Proces somatske embriogeneze dalje postaje autoregulatoran i podrazumeva dostizanje odgovarajućih stupnjeva embriogenog puta bez ili sa minimalnim uticajem spoljašnjih signala (Gaj 2004; Smertenko i Bozhkov 2014).

Kulture somatskih embriona često vode poreklo od jedne ćelije, što je pokazano u različitim istraživanjima više biljnih vrsta iz porodice trava (Vasil i sar. 1985; Jones i Rost 1989). Međutim, postoje radovi koji idu u prilog tome da somatski embrioni u kulturi retko nastaju direktno od pojedinačnih ćelija, već se deobom tih ćelija prvo formira proembrionalna masa ćelija, pa tek onda dolazi do formiranja embriona (Vasil 2008).

Somatski embrioni se mogu razviti ili direktno na eksplantatu, bez posredne kalusne faze, ili indirektno, nakon formiranja kalusa (Williams i Maheswaran 1986). Prema starijem shvatanju, proces direktne somatske embriogeneze odvija se iz ćelija koje poseduju prethodno determinisani embriogeni kapacitet. One se javljaju uglavnom u embrionalnom tkivu i mogu se razviti spontano u somatske embrione. Sa druge strane, u slučaju indirektno somatske embriogeneze, dolazi prvo do formiranja kalusa u kojima su ćelije koje nemaju sposobnost formiranja embriona. Međutim kada se formira kalus, on je ili embriogeni, sastavljen od proembrionalnih masa, ili nije (Von Arnold 2002). To ostavlja nedoumicu u vezi tačne razlike između indirektno i direktne somatske embriogeneze. U najvećem broju slučajeva, somatska embriogeneza se odvija posredstvom kalusne faze, odnosno indirektnim putem (Gaj 2004).

U većini slučajeva kad biljni regulatori rastenja nisu korišćeni za indukciju embriogeneze, somatski embrioni se formiraju direktno na površini eksplantata bez formiranog kalusa (Fehér i sar. 2003). Eksplantati koji imaju najviše potencijala za

somatsku embriogenezu bez kalusne faze jesu zigotski i somatski embrioni, kao i klijanci (Von Arnold i sar. 2002; Smertenko i Bozhkov 2014).

### **1.2.1.2. Indukcija somatske embriogeneze**

Inicijacija embriogenih kultura zavisi od stadijuma razvića početnog biljnog materijala kao i uslova gajenja *in vitro*. Različiti stimulusi mogu indukovati embriogeni put razvića, pri čemu su najznačajniji biljni regulatori rastenja, kao što su auksini i citokinini koji se dodaju hranljivim podlogama (Choi i sar. 1997; Von Arnold i sar. 2002). Oni regulišu ćelijski ciklus i iniciraju ćelijsku deobu (Francis i Sorrell 2001). Pokazano je da mehaničko povređivanje, visoke koncentracije saharoze i osmotski stres (Kamada i sar. 1993), visoke koncentracije soli, joni teških metala (Pasternak i sar. 2002) ili visoka temperatura (Kamada i sar. 1989) takođe mogu da indukuju somatske embrione kod različitih biljnih vrsta (Dudits i sar. 1995).

Inicijacija somatske embriogeneze je ograničena na određeni broj ćelija u primarnom eksplantatu koje su kompetentne da aktiviraju gene uključene u nastajanje embriogenih ćelija (Grafi i sar. 2011; Almeida i sar. 2012). Ova kompetentnost može biti rezultat različite osetljivosti ovih ćelija na auksine (Dudits i sar. 1995). Postoje veoma osetljive biljne vrste kao što je šargarepa, kod koje se skoro svi biljni delovi mogu iskoristiti kao eksplantati za uspostavljenje embriogenih kultura. Sa druge strane, mnoge biljke, kao što su žitarice, nisu osetljive na fizičke i hemijske stimuluse i kod njih samo specifično tkivo, najčešće juvenilno, može da se upotrebi za indukciju somatske embriogeneze (Von Arnold i sar. 2002; Jiménez 2005).

Smatra se da su auksini najvažnija grupa hormona koja učestvuje u indukciji somatske embriogeneze *in vitro* (Cooke i sar. 1993). Od auksina, 2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina (2,4-D) je najviše korišćena u indukciji somatske embriogeneze. 2,4-D je sintetički regulator rastenja koji takođe predstavlja i herbicid, i deluje ne samo kao auksin već i kao efikasni stresor koji inicira embriogeni obrazac razvića kod biljnih ćelija u kulturi *in vitro* (Fehér i sar. 2003). Indukcija somatske embriogeneze se najverovatnije odvija uspostavljanjem auksinskog gradijenta što je neophodno za iniciranje bilateralne simetrije tokom embriogeneze (Liu i sar. 1993).



Dužina primene auksina u indukciji somatskih embriona zavisi od upotrebljenog eksplantata. Određeni eksplantati zahtevaju izlaganje auksinu nekoliko dana pre nego što postanu kompetentni da uđu u somatsku embriogenezu. Nakon toga, potrebno je uklanjanje auksina da bi došlo do razvoja somatskih embriona iz kompetentnih ćelija. Kod nekih eksplantata je dovoljno samo kratko izlaganje auksinima tokom nekoliko minuta do nekoliko sati (Dudits i sar. 1993). Na taj način, vremenske i prostorne promene u endogenom nivou auksina mogu biti jedan od prvih signala koje vode ka somatskoj embriogenezi (Fehér i sar. 2003). Takođe, kod nekih vrsta i endogeni nivoi abscisinske kiseline (ABA) kao i citokinina mogu imati značaj za inicijaciju embriogenih kultura (Senger i sar. 2001; Pintos i sar. 2002).

### **1.2.1.3. Razviće somatskih embriona**

Nakon indukcije somatske embriogeneze, odnosno sticanja kompetentnosti, počinje formiranje somatskih embriona. Ovaj proces može biti podstaknut različitim faktorima, zavisno od vrste, sorte i fizioloških karakteristika majke biljke. Obično nakon promene koncentracije biljnih regulatora rastjenja u hranljivoj podlozi, izvora ugljovodonika ili osmotskog potencijala, indukovane ćelije, odnosno tkiva ispoljavaju svoju embriogenu kompetentnost i diferenciraju se u somatske embrione (Jiménez 2005).

U onim slučajevima u kojima je primena auksina najefikasniji tretman za indukciju somatske embriogeneze, dalje razviće somatskih embriona se često postiže smanjenjem koncentracije ili uklanjanjem auksina iz hranljive podloge. Smatra se da konstantno gajenje na podlozi sa auksinom kao što je 2,4-D, dovodi do toga da proembrionalne mase pored produkata gena neophodnih za formiranje globularnog stadijuma embriogeneze, sadrže i mnoge druge iRNK i proteine čije kontinuirano prisustvo inhibira nastavak procesa embriogeneze (Zimmerman 1993; Filonova i sar. 2000). Pokazano je da je za normalnu morfogenezu nakon stadijuma globule neophodan odgovarajući polarni transport auksina (Liu i sar. 1993). Endogeni nivo IAA mora biti smanjen kako bi se uspostavio polarni auksinski gradijent, a prisustvo auksina u podlozi ne dozvoljava smanjenje endogenog nivoa IAA, i time inhibira razviće embriona (Jiménez i sar. 2005).

Embriogene kulture nekih vrsta i genotipova mogu da se gaje duže na hranljivim podlogama sa auksinima i da pri tom zadrže pun embriogeni potencijal za proizvodnju somatskih embriona, koji se dalje razvijaju u biljke (Von Arnold i sar. 2002; Park i sar. 2005).

Razviće somatskog embriona obuhvata ključne stadijume zigotske embriogeneze (Zimmerman 1993; Von Arnold i sar. 2002; Jiménez 2005). 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). Za razliku od zigotske embriogeneze koja počinje od jedne ćelije od koje nastaje globularni embrion sa određenim brojem ćelija, somatska embriogeneza počinje od jedne ili grupe ćelija, a globularna struktura se sastoji od promenljivog broja ćelija (Smertenko i Bozhkov 2014). Dalje razviće obuhvata sticanje polarnosti, sa formiranim začecima kotiledona i meristemom izdanka na jednom kraju i meristemom korena na drugom. Ovaj stadijum se naziva srcasti. Zatim dolazi do daljeg izduživanja hipokotila i razvoja korenka u torpedo stadijumu koji se nastavlja u rani i kasni kotiledonarni stadijum sa zelenim kotiledonima, izduženim hipokotilom i razvijenim korenkom (Zimmerman 1993).

Somatski embrioni liče na zigotske i morfološki i fiziološki (Zimmerman 1993; Von Arnold i sar. 2002). I zigotski i somatski embrioni imaju tipičnu embriogenu strukturu, odnosno apikalno-bazalnu i radijalnu polarnost, kao i primarne meristeme korena i izdanka. Ključni geni koji kontrolišu zigotsku embriogenezu imaju slične uloge i tokom somatske (Mordhorst i sar. 2002; De Smet i sar. 2010). Takođe, somatski embrioni akumuliraju slične hranljive materije neophodne za klijanje. Međutim, kod zigotskih embriona dolazi do dehidracije i pripreme za dormanciju koje kompletiraju proces formiranja semena, najvećim delom pod uticajem ABA (Thomas 1993), dok se somatski embrioni u najvećem broju slučajeva kontinualno diferenciraju, aktivacijom meristema korena i izdanka bez stadijuma mirovanja i prethodne dehidracije (Zimmerman 1993; Smertenko i Bozhkov 2014).

#### 1.2.1.4. Očuvanje embriogenog potencijala tokom vremena

Preduslov za uspostavljanje uspešne somatske embriogeneze podrazumeva dobar izbor biljnog materijala, tj. odabir eksplantata koji su izvor kompetentnih ćelija. Sa druge strane, određivanje fizičkih i hemijskih faktora koji indukuju njihov embriogeni put razvića je izuzetno važan (Gaj 2004). Ukupni potencijal neke kulture za somatsku embriogenezu je najviši kada je kultura relativno mlada, tokom prve godine i zadržava se unutar proembrionalnih masa (Zimmerman 1993). Razlozi zbog kojih se embriogeni potencijal gubi ili vremenom smanjuje nisu poznati. Primećeno je da se kod nekih vrsta embriogene i neembriogene ćelije razlikuju po sadržaju endogenih auksina, odnosno da ih je više kod embriogenih (Guiderdoni i sar. 1995). Dalje je primećeno da se smanjenje embriogenog kapaciteta posle dužeg gajenja na podlogama za indukciju somatske embriogeneze poklapa sa smanjenjem endogenog nivoa IAA (Jiménez i Bangerth 2001). Smatra se da je jedan od činilaca koji utiču na embriogeni potencijal sinteza i metabolizam endogenih hormona kao što su auksini (Chuck i Hake 2005).

Jedan od vidova očuvanja embriogenog potencijala u pojedinim kulturama je pojava sekundarne embriogeneze. Sekundarna ili repetitivna embriogeneza podrazumeva formiranje novih somatskih embriona na prethodnoj generaciji somatskih embriona. Ova pojava je opisana kod velikog broja biljnih vrsta (Raemakers i sar. 1995) i pogodna je za kloniranje i masovnu proizvodnju embriona (Kamle i sar. 2011). Neke kulture imaju sposobnost da održe kompetenciju za sekundarnu embriogenezu dugi niz godina i tako obezbede materijal koristan za mnoga istraživanja (Martinelli i sar. 2001).

#### 1.2.2. *De novo* organogeneza

*De novo* organogeneza biljaka *in vitro* je proces tokom kojeg se, pod određenim fizičkim i hemijskim uslovima, organi kao što su korenovi i izdanci, *de novo* formiraju iz različitih delova biljaka, odnosno eksplantata koji ne sadrže primordije tih organa (Thorpe 1980). *In vitro* organogeneza izdanka i korena se primetno razlikuje od njihovog razvića tokom zigotske embriogeneze. Naime, tokom *de novo* organogeneze, formiranje meristema izdanka ili korena se inicira od dediferenciranih somatskih ćelija, a ne od embrionalnih ćelija kao kod embriogeneze.

Za proces *de novo* organogeneze neophodan je balans odgovarajućih regulatora rasteња, odnosno auksina i citokinina u hranljivoj podlozi. Još polovinom 20. veka, Skoog i Miller (1957) su pokazali regulatorne efekte ovih hormona na proces organogeneze *in vitro*, pri čemu njihovo prisustvo u određenim koncentracijama u hranljivoj podlozi ima ulogu u određivanju morfološkog puta eksplantata i formiranju različitih organa (Christianson i Warnick 1985). Naime, odnos u kojem preovlađuju auksini u odnosu na citokinine promoviše formiranje korena. Sa druge strane, odnos u kojem preovlađuju citokinini vodi ka formiranju izdanaka. Takođe, ne samo odnos, već i koncentracija egzogeno primenjenih hormona ima važnu ulogu u usmeravanju diferencijacije ćelija tokom organogeneze ka formiranju izdanaka ili korenova (Zhao i sar. 2008).

Iako je značaj istraživanja Skoog-a i Miller-a ogroman za regeneraciju biljaka, pokazalo se da nisu sve biljke isto osetljive na regulatore rasteња (Oinam i sar. 2011). Naime, pre same regeneracije organa odvija se niz procesa, tako da je, u zavisnosti od vrste biljaka, neophodno primeniti različite tretmane (Cary i sar. 2002; Che i sar. 2007). Do nedavno, istraživanja *in vitro* organogeneze su bila ograničena prvenstveno na morfološki i fiziološki nivo. Međutim, danas je zahvaljujući molekularnim markerima omogućeno razumevanje ovog procesa i na molekularnom nivou. Do novih otkrića se došlo zahvaljujući izučavanju *de novo* organogeneze kod model-biljke *Arabidopsis thaliana*, kao i istraživanjima generalne uloge auksina i citokinina u razviću biljaka.

### 1.2.2.1. Predloženi model razvića organa tokom *de novo* organogeneze

*De novo* organogeneza može biti direktna ili indirektna. Tokom direktnog puta, formiranje meristema i dalje začetaka organa se odvija bez formiranja posrednog kalusnog tkiva, već direktno dediferencijacijom i rediferencijacijom ćelija eksplantata. U drugom slučaju, dediferencirane ćelije se najpre intenzivno dele pri čemu nastaje kalus, u okviru koga se zatim formiraju meristemski centri (Yancheva i sar. 2003; Gahan i George 2008).

Tokom *de novo* organogeneze, novi organi (izdanak ili koren) mogu da se razvijaju na eksplantatima, tj. odsečcima različitih biljnih organa, kao što su listovi, stabla

ili korenovi. Ovaj proces zavisi od egzogeno primenjenih regulatora rastenja, kao i specifičnih receptora (Magyar-Tábori i sar. 2010). Primećena je velika varijabilnost u frekvenciji organogeneze između varijeteta i vrsta biljaka, što verovatno zavisi od proporcije ćelija koje su osetljive na primenjene regulatore rastenja. Molekularne i genetičke analize *de novo* organogeneze podržavaju model po kome je ovaj proces u osnovi podeljen na tri faze (Sugiyama 1999; Zhang i Lemaux 2004). U prvoj fazi, ćelije tkiva eksplantata postaju sposobne da odgovore na biljne regulatore rastenja (Howell i sar. 2003). To vodi ka sticanju kompetencije za organogenezu, što podrazumeva dediferencijaciju ćelija. Zatim, u drugoj fazi kompetentne ćelije u eksplantatima ponovo ulaze u ćelijski ciklus i njihov razvojni put se menja u cilju formiranja specifičnih začetaka organa. Ovo predstavlja ključni korak u organogenezi koji zavisi od specifičnog odnosa hormona u hranljivoj podlozi (Gahan i George 2008). Dakle, kada somatske ćelije adekvatno odgovore na egzogeno primenjene regulatore rastenja, one mogu biti reprogramirane tako da uđu u put *de novo* organogeneze, odnosno da se razvijaju u drugom pravcu i daju organe za koje u početnom eksplantatu nisu postojale primordije. U poslednjoj fazi odvija se *in vitro* morfogeneza. Iako se smatralo da je ova faza nezavisna od egzogeno primenjenih hormona (Sugiyama 1999), pokazano je da su određeni tip auksina kao i dužina i momenat njihove primene kritični i za aktivaciju i za napredovanje programa razvića organa (Yancheva i sar. 2003).

#### **1.2.2.2. Uloga biljnih regulatora rastenja u procesu *de novo* organogeneze**

Auksini i citokinini imaju važnu ulogu u mnogim aspektima rastenja i razvića biljaka. Interakcija između auksina i citokinina je naročito važna u kontrolisanju formiranja i održavanja meristema koji su neophodni za formiranje celog organizma. U većini slučajeva, ćelije koje su uključene u regeneraciju organa nisu direktno u kontaktu sa regulatorima rastenja u hranljivoj podlozi, što ukazuje na to da transdukcija hormonskih signala ima važnu ulogu u odgovoru eksplantatskih ćelija na biljne hormone.

Uspešni protokoli za *de novo* organogenezu, uključujući pre svega protokol za regeneraciju izdanaka kod *A. thaliana*, podrazumevaju dva uzastopna koraka. Prvi tretman je gajenje eksplantata na hranljivoj podlozi u kojoj je koncentracija auksina

veća od koncentracije citokinina, koja se označava i kao podloga za indukovanje kalusa – CIM (eng. *Callus Induction Medium*). Ovaj korak je dalje praćen gajenjem eksplantata na podlozi u kojoj je koncentracija citokinina veća od koncentracije auksina, tj. podlozi za indukovanje izdanaka – SIM (eng. *Shoot Induction Medium*). Tokom ovakvog tretmana biljnog materijala, sticanje organogene kompetencije i formiranje začetaka organa je indukovano auksinima, dok je usmeravanje primordija u pravcu razvoja izdanka kontrolisano citokinima (Motte i sar. 2014).

Kod *A. thaliana* je pokazano da tokom regeneracije izdanaka iz eksplantata korena prilikom gajenja na CIM-u, kompetenciju za formiranje organa stiče grupa ćelija iz pericikla (Che i sar. 2007). Takođe je pokazano da su događaji tokom ovakvog regenerativnog puta veoma slični onima koji se dešavaju tokom formiranja bočnih korenova *in planta*, kao i da su kalusi nastali od korena, lista ili hipokotila slični začecima korena (Sugimoto i sar. 2010). Ovi kalusi ili začeci organa stiču kompetenciju da formiraju organe, odnosno postaju sposobni da odgovore na određene hormonske signale (Che i sar. 2007). U tom trenutku oni mogu dati ili izdanak ili koren i mogu se smatrati začecima organa, a tkivo koje se dobija nakon indukcije na CIM-u označava se kao organogeni kalus. Kada se eksplantati produženo gaje na podlozi bogatoj auksinima, začeci organa će postati determinisani za formiranje korena a izgubiće sposobnost da formiraju izdanke (Cary i sar. 2002; Gordon i sar. 2009).

Kada se eksplantati prebace na SIM, dolazi do daljeg razvića izdanka, pri čemu veliki značaj ima interakcija auksinskih i citokininskih signalnih puteva. Pokazano je da tokom inkubacije na CIM-u, u tkivu eksplantata dolazi do povećanja ekspresije brojnih gena auksinskog odgovora, a nakon prebacivanja na SIM dolazi do snižavanja nivoa njihove ekspresije. Imajući u vidu da SIM podrazumeva prisustvo veće koncentracije citokinina u odnosu na auksine, može se zaključiti da upravo citokinini predstavljaju glavne faktore odgovorne za indukciju regeneracije izdanka iz kalusa (Che i sar. 2002; Cary i sar. 2002).

### 1.2.2.3. Molekularni aspekt *de novo* organogeneze

Molekularni aspekt *de novo* organogeneze je za sada dobro izučen samo kod model-biljke *A. thaliana* tokom regeneracije izdanaka iz odsečaka korenova. Već je rečeno da prisustvo auksina u hranljivoj podlozi dovodi do formiranja organogenog kalusa, odnosno ćelije pericikla počinju da se dele, što dovodi do stvaranja začetka organa sa kompetencijom za formiranje izdanaka. Preduslov za navedene događaje je stvaranje lokalnog auksinskog gradijenta. Auksinski gradijent se formira posredstvom auksinskih transportnih proteina a to dalje vodi ka aktivaciji odgovora indukovanih auksinima u ćelijama pericikla (Che i sar. 2007). Kod *A. thaliana* su pronađene tri familije auksinskih transportera: za efluks auksina odgovorni su PIN ("PINFORMED") proteini i PGP ("MULTIDRUG RESISTANCE-p-glycoprotein") proteini, a za influks AUX1 ("AUXIN-RESISTANT1"), odnosno LAX ("LIKE AUX1") proteini.

Sintetički auksini, kao što je 2,4-D ili  $\alpha$ -naftil-sirćetna kiselina (NAA), se često koriste u indukciji *de novo* organogeneze. Oni se odlikuju specifičnim karakteristikama koje im omogućavaju da se akumuliraju u ćelijama eksplantata, ostvarujući maksimalne koncentracije auksina i zahvaljujući tome, neophodni auksinski gradijent (Motte i sar. 2014). Tako, 2,4-D se ne transportuje iz ćelija pomoću PIN transportera, a NAA može ući u ćeliju i nezavisno od AUX/LAX proteina (Delbarre i sar. 1996). Interesantno je da iako su auksinski PIN transporteri značajni za formiranje gradijenta tokom formiranja organa (Benková i sar. 2003), pokazano je da inhibicija polarnog transporta na samom početku *de novo* organogeneze stimuliše formiranje organogenog kalusa (Pernisová i sar. 2009).

Akumulacija auksina u ćelijama pericikla aktivira signalnu kaskadu koja vodi ka asimetričnim deobama onih ćelija koje imaju sposobnost da odgovore na ovaj auksinski signal. To dalje pokreće "nizvodne" komponente auksinskog signalnog puta (Motte i sar. 2014). Značajne su dve klase transkripcionih regulatora, a to su faktori auksinskog odgovora tj. ARF proteini ("AUXIN RESPONSE FACTOR") i Aux/IAA proteini (Quint i Gray 2006). ARF proteini mogu funkcionisati ili kao aktivatori ili kao represori u regulaciji genske ekspresije indukovane auksinom, dok Aux/IAA proteini negativno regulišu signalne puteve indukovane auksinom (Ulmasov i sar. 1997; 1999).

Tokom gajenja na CIM-u takođe dolazi do indukcije gena koji su uključeni u formiranje bočnih korenova, što ukazuje na podudaranje između formiranja začetaka lateralnih korenova i začetaka od kojih će se formirati *de novo* izdanci. Pokazano je da čak trećina gena čija je ekspresija povišena tokom indukcije kalusa predstavlja gene koji su aktivirani u vršnoj zoni korena (Sugimoto i sar. 2010).

Takođe, pokazano je da *AtIPT5*, gen koji je uključen u biosintezu citokinina i *ARR5* (“*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 5*“), gen koji kodira regulator citokininskog odgovora, imaju uporedive obrasce ekspresije u zaćecima boćnih korenova tokom razvića i zaćecima organa formiranih na CIM-u (Miyawaki i sar. 2004; Atta i sar. 2009). Ovi podaci ukazuju na to da i citokinini imaju ulogu u ranim fazama regeneracije izdanaka.

Nakon formiranja organogenog kalusa, visoka koncentracija citokinina u hranljivoj podlozi SIM određuje identitet zaćetaka organa u kalusu, a to je u ovom slućaju identitet izdanaka (Gordon i sar. 2009). Uspešnost regeneracije zavisi najpre od sposobnosti usvajanja citokinina od strane ćelija sa stećenom organogenom kompetencijom. Usvajanje citokinina iz hranljive podloge se odlikuje višefaznom kinetikom. Pokazano je da specifićna aromatićna jedinjenja kao što je karbonil cijanid m-hlorofenil hidrazon (CCCP), koja omogućavaju protonima da prođu lipidni dvosloj ćelijske membrane, nakon dodavanja u podlogu dovode do potpunog prekida citokininskog transporta. Zbog toga se pretpostavlja da se usvajanje citokinina uglavnom obavlja posredstvom citokininskog transportnog sistema spregnutog sa protonima (Cedzich i sar. 2008).

Nivo endogenih citokinina u biljkama zavisi od njihove biosinteze, degradacije i modifikacija. Pored endogenog nivoa citokinina, vaćan faktor za razviće predstavlja i prostorna distribucija ovih hormona. Genetićke i molekularne analize su otkrile vaćne gene ukljućene u transdukciju citokininskih signala kod *A. thaliana* (Hwang i Sheen 2001; Haberer i Kieber 2002). Tako, ulogu citokininskih transmembranskih receptora vrše histidinske protein kinaze oznaćene kao AHKs. Pokazano je da tokom indukcije na CIM-u dolazi do akumuliranja AHK4 na određenim mestima u tkivu povećavajući osetljivost na citokinine čime ova mesta postaju predodređena za formiranje izdanaka (Gordon i sar. 2009).



AHP proteini, odnosno histidin-fosfotransferaze (“ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHO-TRANSFER PROTEINS”) prenose dalje signal od AHKs do regulatora citokininskog odgovora, odnosno ARR proteina tipa A i tipa B koji dalje aktiviraju ili sprečavaju transkripciju gena (Suzuki i sar. 2000). Na taj način, stimulacija ili inhibicija signalnog puta “nizvodno” od AHP proteina dramatično utiče na organogenezu.

ARR proteini tipa A i B se razlikuju kako po strukturi, tako i po funkciji (To i Kieber, 2008). Aktivacija ARR proteina tipa B dovodi do pojačane transkripcije gena za ARR proteine tipa A (Sakai i sar. 2001), kao i gena za faktore citokininskog odgovora (“CYTOKININ RESPONSE FACTOR” – CRF; Rashotte i sar. 2003). ARR proteini tipa A su negativni regulatori citokininskog odgovora (To i sar. 2007). Oni mehanizmom negativne povratne sprege deluju na različite elemente citokininske signalne kaskade (Lee i sar. 2007) i deluju inhibitorno na meristemsku aktivnost (Buechel i sar. 2010). Aktivacija citokininske signalne kaskade stimuliše prelazak produkata ekspresije *CRF* gena u nukleus, gde deluju kao transkripcioni faktori. Oni sa ARR proteinima tipa B stimulišu transkripciju niza gena odgovornih za efektorske funkcije citokininskog odgovora, među kojima je razviće izdanka i korena (Rashotte i sar. 2006).

Kod *A. thaliana* je pokazano da tokom zigotskog razvića kao odgovor na prisustvo citokinina dolazi do ekspresije *WUS* (“*WUSCHEL*“, Mayer i sar. 1998) gena. Ovaj gen kodira transkripcioni faktor čija aktivnost vodi ka daljoj signalizaciji, što dovodi do ekspresije *CLV3* (“*CLAVATA 3*“, Fletcher i sar. 1999) gena u matičnim ćelijama. Produkt ovog gena interaguje sa *CLV1/CLV2* receptorskim kompleksom, čime se ograničava područje ekspresije *WUS* gena. Na taj način, organizacija i funkcionisanje embrionalnog apikalnog meristema izdanka su regulisani mehanizmom negativne povratne sprege kojom *CLV3* proteini utiču na ekspresiju *WUS* gena, a to obezbeđuje kontrolu broja matičnih ćelija prisutnih u centralnoj zoni apikalnog meristema (Weigel i Jürgens 2002). Organi izdanka nastaju od 6 do 9 ćelija, i to uglavnom matičnih ćelija (Laux i sar. 2003). Tokom postembrionalnog razvića, za ekspresiju *CLV3* neophodni su i *WUS* i *STM* (produkt “*SHOOT MERISTEMLES*“ gena) (Brand i sar. 2002). Transkripcioni faktori *WUS* i *STM* su ključni tokom formiranja meristema kao i njegovog održavanja, ali oni deluju nezavisno jedan od drugog (Lenhard i sar. 2002).

Tokom *de novo* organogeneze, inkubacija na SIM-u dovodi do ekspresije brojnih gena regulisanih citokinima, koji leže u osnovi inicijacije formiranja izdanka (Che i sar. 2002). Pokazano je da i tokom ovog procesa citokinini iniciraju ektopičnu ekspresiju *WUS* gena u kalusu (Cary i sar. 2002; Gordon i sar. 2007; 2009). Produkt ovog gena kao transkripcioni faktor direktno smanjuje ekspresiju *ARR* tipa A, što utiče na citokininsku signalizaciju i samim tim na proces regeneracije (Buechel i sar. 2010).

Ekspresija *WUS* gena se tokom gajenja na SIM-u odvija u dve faze. U prvoj fazi, ekspresija je uočena u tkivu eksplantata na mestima koja okružuju preteču izdanka i u kojima se eksprimira gen *CUC2* ("*CUP-SHAPED COTYLEDON 2*"). Povećana ekspresija *CUC1* i *CUC2* je uočena i tokom formiranja kalusa na auksinskom pretretmanu (Cary i sar. 2002; Gordon i sar. 2007). Ekspresija ova dva gena tokom regeneracije aktivira *STM* gen (Hibara i sar. 2003). I *WUS* i *STM* su neophodni i dovoljni za *de novo* formiranje izdanaka. *STM* pripada *KNI* ("*KNOTTED 1*") tipu gena. *KNI* je pronađen kod kukuruza (Vollbrecht i sar. 1991) i pokazano je da on kao i njemu slični geni kod *A. thaliana* imaju ključnu ulogu u inicijaciji meristema i održavanju nediferenciranih ćelija u centralnoj zoni apikalnog meristema izdanka (Long i sar. 1996). Brand i saradnici (2002) su pokazali da se zahvaljujući *STM*, bar kada se eksprimira u okviru meristema, determiniše razvojni put izdanka. Takođe, pokazano je da ekspresija *STM* stimuliše biosintezu citokinina u apikalnom meristemu izdanka (Yanai i sar. 2005).

U drugoj fazi, ekspresija *WUS* gena biva ograničena na ona mesta na kojima je tokom gajenja na CIM-u aktiviran receptorski *AKH4* gen. Povećana transkripcija *AKH4* gena je neophodna za aktivaciju *WUS* tokom indukcije izdanka (Gordon i sar. 2007; Chatfield i sar. 2013). Egzogeno primenjeni auksini povećavaju ekspresiju *AKH4* na CIM-u, a njegov produkt zatim pojačava odgovor na egzogeno primenjene citokinine nakon prebacivanja na SIM. Nakon ekspresije *WUS* gena, dolazi do ekspresije *CLV3* gena u vršnom delu začetka organa koji se razvija u apikalni meristem izdanka (Chatfield i sar. 2013).

Zhang i saradnici (1998) su pokazali da *KNI* tip gena može predstavljati pouzdan molekularni marker za detekciju formiranja meristema izdanka *in vitro*, a takođe je pokazano da formiranje meristema izdanaka *in vitro* najverovatnije prati iste

puteve kao i prilikom razvića meristema izdanka *in planta*. Dodatno, ispitivanja obrazaca ekspresije “*Brostm*“ gena, *KNI*-tip gena kod *Brassica oleracea*, i “*Brocy*“ gena, ciklin-tip gena kod pripadnika roda *Brassica*, tokom *de novo* organogeneze, pokazala su da do prekretnice u obrascu razvića dolazi pre nego što započnu ćelijske deobe (Teo i sar. 2001). Ove promene su obuhvatale manje grupe floemskih parenhimskih ćelija u sastavu stabla, a za indukciju ekspresije “*Brostm*“ gena bilo je neophodno prisustvo citokinina. Ekspresija ovog gena je trajala tokom ćelijskih deoba koje su dovele do formiranja organa.

#### **1.2.2.4. Značaj *de novo* organogeneze**

*De novo* organogeneza predstavlja jedan od glavnih puteva koji se koriste za regeneraciju biljaka *in vitro*. Takođe, predstavlja kritičan korak u protokolima za transformaciju biljaka. *De novo* organogeneza je pronašla široku primenu u mutagenezi, poliploidizaciji, kao i u skladištenju germplazme, a može poslužiti i kao koristan eksperimentalni sistem za proučavanje regulatornih mehanizama razvića biljaka (Zhao 2008) Tako, pojedinačni tipovi organa, kao što su korenovi ili izdanci, mogu biti regenerisani iz različitih tkiva u cilju istraživanja interakcija hormona tokom organogeneze kod biljaka (Su i sar. 2011).

#### **1.2.3. Regeneracija biljaka kelerabe *in vitro***

Uslovi za regeneraciju biljaka *in vitro* kod brojnih pripadnika roda *Brassica* su intenzivno izučavani tokom poslednjih godina (Cardoza i Stewart 2004; Vinterhalter i sar. 2007). U najviše proučavane vrste spadaju *B. oleracea* (Hansen i sar. 1999; Sparrow i sar. 2004; Sretenović-Rajičić i sar. 2004; 2006; Chikkala i sar. 2009), *B. juncea* (Zhang i sar. 2006), *B. napus* (Koh i Loh 2000; Moghaieb i sar. 2006; Haddadi i sar. 2008) i *B. campestris* (Paul i Sikdar 2005).

Iako je somatska embriogeneza korišćena u sistemima za regeneraciju i transformaciju mnogih biljnih vrsta, kod pripadnika roda *Brassica* to i nije slučaj. Razlog tome jeste to što su protokoli za regeneraciju putem organogeneze kod

kupusnjača dosta dobro opisani i pokazali su se kao vrlo uspešni kod većine vrsta (Cardoza i Stewart 2004). Somatska embriogeneza je opisana kod *B. napus* (Ilić-Grubor i sar. 1998; Turgut i sar. 1998; Koh i Loh 2000; Zeynali i sar. 2010), *B. oleracea* (Dias i Martins 1999; Leroy i sar. 2000; Qin i sar. 2007; Yang i sar. 2010), *B. rapa* (Choi i sar. 1996) i *B. carinata* (Barro i Martin 1999). Kao početni biljni materijal u protokolima za somatsku embriogenezu kod vrsta roda *Brassica* korišćeni su nezreli zigotski embrioni (Choi i sar. 1998), hipokotili (Deane i sar. 1997; Koh i Loh 2000; Leroy i sar. 2000; Qin i sar. 2007; Zeynali i sar. 2010), kotiledoni (Choi i sar. 1996; Qin i sar. 2007; Zeynali i sar. 2010), ili korenovi (Yang i sar. 2010).

Smatra se da *de novo* organogeneza izdanaka predstavlja najviše korišćeni put regeneracije za mnoge vrste roda *Brassica* u poređenju sa drugim načinima regeneracije (Cardoza i Stewart, 2004). Ona predstavlja osnovno oruđe za regeneraciju biljaka *in vitro*. Razvijeni su brojni protokoli koji koriste različit početni biljni materijal kao što su hipokotili (Khan i sar. 2003; Ghnaya i sar. 2008; Pavlović i sar. 2010), listovi (Glendening i Sjolund 1988; Abbasi i sar. 2011), korenovi (Lillo i Shanin 1986), kotiledoni (Ono i sar. 1994; Cogbill i sar. 2010), protoplasti (Hu i sar. 1999), i cvetni segmenti (Bhalla i De Weerd 1999).

Keleraba je najmanje proučavana od svih kupusnjača. Pretpostavlja se da su razlozi za to poteškoće vezane za regeneraciju biljaka. Postoji samo nekoliko prethodno objavljenih pokušaja *in vitro* regeneracije kelerabe. To je najpre rad Glendening-a i Sjolund-a (1988) koji su u svojim istraživanjima koristili visoke koncentracije biljnih regulatora rasteња, čak do 10 mg L<sup>-1</sup> citokinina N<sup>6</sup>-benzilaminopurin-a (BAP) i 1 mg L<sup>-1</sup> auksina NAA u hranljivoj podlozi, u cilju indukcije *de novo* organogeneze na odsećcima listova kelerabe. Klima i saradnici (2004), koji su koristili kulturu mikrospora kelerabe, opisali su relativno visoku frekvenciju androgene embriogeneze, ali su zaključili da je za dobijanje vijabilnih regenerisanih biljaka neophodna optimizacija protokola.

### 1.3. Citokinini

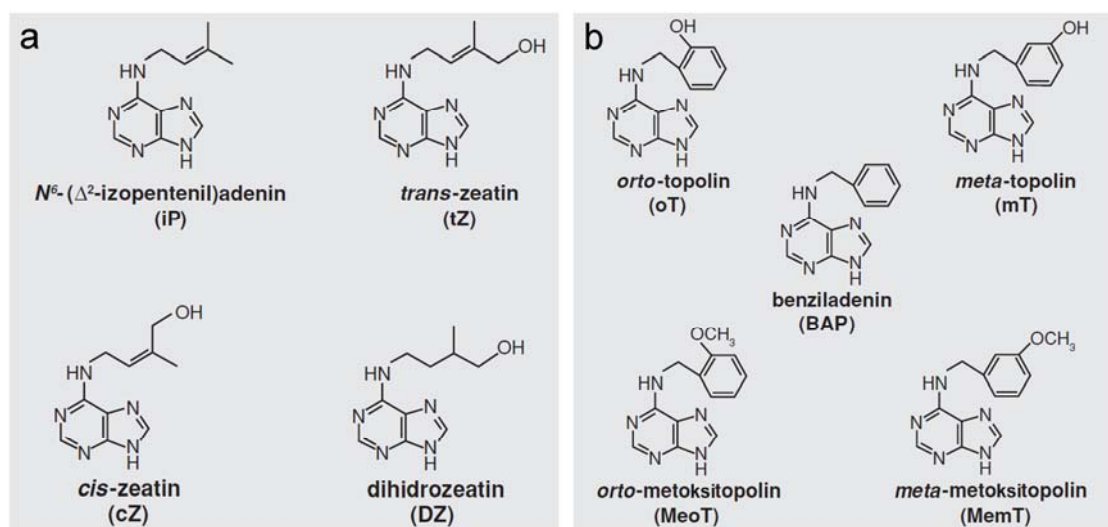
Citokinini predstavljaju klasu hormona koja je široko rasprostranjena u biljnom svetu. Oni ispoljavaju različite efekte na važne fiziološke procese u biljkama kao što su indukcija ćelijskih deoba, *de novo* organogeneza izdanaka, stimulacija rasteća mirujućih pupoljaka, odlaganje senescencije listova i mnoge druge (Mok i Mok 2001; Mazid i sar. 2011).

Citokinini su otkriveni pedesetih godina 20. veka, kao faktori koji stimuliraju deobu biljnih ćelija u prisustvu do tada jedinog poznatog hormona, auksina. Završna faza ćelijskih deoba je poznata i kao citokineza, pa su po njoj ovi hormoni i dobili ime citokinini. Otkriće citokinina se pripisuje naučnicima Skoog-u i Miller-u koji su proučavali deobu ćelija u tkivu srži duvana pod uticajem različitih izvora purinskih baza. Nakon primene izolata DNK iz sperme haringe, koji je bio delimično degradovan nakon autoklaviranja, uočen je snažan efekat na deobu ispitivanih ćelija. Iz ovog preparata izolovan je produkt oksidativne degradacije DNK koji je nazvan kinetin, i identifikovan je kao prvi citokinin (Miler i sar. 1955a; 1955b). Nekoliko godina kasnije, Letham (1963) je izolovao i prvi prirodni citokinin, zeatin, iz nezrelog endosperma kukuruza (*Zea mays*).

#### 1.3.1. Struktura citokinina

Prirodni citokinini predstavljaju derivate purinske baze adenina, kod kojih je izvršena  $N^6$ -supstitucija. Na osnovu hemijske prirode supstituenta, citokinini se mogu podeliti na izoprenoidne i aromatične.

Izoprenoidni citokinini (**Slika 3a**) se formiraju kada se jedna izoprenoidna C5 jedinica, nastala od dimetil-alil-difosfata (DMAPP), veže za  $N^6$  atom adenina. U ovu klasu citokinina spadaju slobodne baze  $N^6$ -( $\Delta^2$ -izopentenil) adenin (iP), *trans*-zeatin (*transZ*), *cis*-zeatin (*cisZ*), dihidrozeatin (DHZ) kao i njihovi derivati. *Trans*- i *cis*-izomeri zeatina nastaju hidrosilacijom bočnog lanca iP, koja se može odvijati ili u *trans*- ili u *cis*-položaju. DHZ nastaje nakon zasićenja dvogube veze u zeatinu.



**Slika 3.** Hemijske strukture prirodnih (a) izoprenoidnih i (b) aromatičnih citokinina (Prema Sakakibara 2006).

Izoprenoidni citokinini su pronađeni kod svih ispitivanih vrsta biljaka (Sakakibara 2006). Najšire rasprostranjeni prirodni izoprenoidni citokinini jesu iP i *transZ*, pri čemu *transZ* ima najznačajniju biološku ulogu. Zastupljenost izoprenoidnih citokinina može varirati od vrste do vrste biljaka, pa su tako kod *A. thaliana* najzastupljeniji pomenuti iP i *transZ*, dok je kod kukuruza to *cisZ* (Veitch i sar. 2003). Takođe, uočena je razlika u sadržaju ovih citokinina u i samim biljnim tkivima tokom različitih stadijuma razvića (Meijón i sar. 2011; Cuesta i sar. 2102).

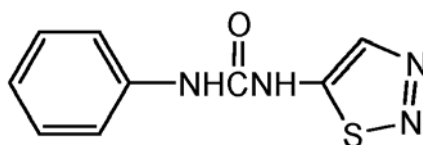
Dugo vremena se smatralo da je *cisZ* neaktivna ili slabo aktivna forma citokinina, s obzirom na to da su ranija istraživanja pokazala slabu biološku aktivnost *cisZ* u nekim biološkim testovima za detekciju citokininske aktivnosti (Schmitz i sar. 1972; Kamínek i sar. 1979). Međutim, u poslednje vreme sve veća važnost se pridaje i *cis*-zeatinu. Kod brojnih biljnih vrsta je pokazano da *cis*-izomeri zeatina predstavljaju više od 50% ukupnog nivoa citokinina (Gajdošová i sar. 2011; Stirk i sar. 2012). Takođe, potvrđena je i njihova uključenost u mnoge procese tokom rastenja i razvića biljaka, između ostalog u sazrevanju i klijanju semena (Emery i sar. 1998; Stirk i sar. 2012).

Aromatični citokinini (Slika 3b) nastaju kada se za *N*<sup>6</sup> atom adenina veže aromatično jezgro, koje može biti supstituisano hidroksi- ili metoksi-grupom (Strnad

1997). Kada se supstitucija aromatičnog prstena vrši hidroksilnom grupom, nastaju hidroksil-derivati: *orto*-topolin (oT) i *meta*-topolin (mT), a supstitucijom metoksi-grupom nastaju metoksi-derivati, *orto*-metoksitopolin (meoT) i *meta*-metoksitopolin (memT) (Tarkowská i sar. 2003). Prvi identifikovani aromatični citokinin jeste  $N^6$ -benzilaminopurin, odnosno  $N^6$ -benziladenin (BAP). On je najpre izolovan iz topole (Horgan i sar. 1973), a zatim je njegovo prisustvo pokazano i kod većeg broja drugih vrsta (Stirk i sar. 2012), među kojima su paradajz (Nandi i sar. 1989) i *A. thaliana* (Tarkowská i sar. 2003).

Aromatični citokinini su ređe zastupljeni u biljnom svetu od izoprenoidnih, ali se sve više potvrđuje njihovo prisustvo kod vaskularnih biljaka (Strnad 1997; Stirk i sar. 2012). Takođe, smatra se da aromatični citokinini imaju značajniju ulogu u zrelim, diferenciranim tkivima nego u mladim tkivima sa intenzivnom ćelijskom deobom (Stirk i sar. 2012).

Pored prirodnih postoje i sintetički citokinini koji nemaju adeninsku strukturu, već po svojoj hemijskoj strukturi predstavljaju derivate feniluree (Mok i Mok, 2001). Sintetički citokinini su supstance koje imaju citokininski efekat, pri čemu ga neki imaju kao direktnu posledicu vezivanja za proteine koji vezuju citokinine. Drugi sintetički citokinini imaju posredan efekat, npr. preko inhibicije citokinin oksidaze/dehidrogenaze (CKX), enzima odgovornog za ireverzibilnu degradaciju citokinina. U sintetičke citokinine spadaju *N*-fenil-*N'*-(2-hloro-4-piridil)-urea (CPPU) i tidiazuron (TDZ, **Slika 4**), koji predstavljaju analoge difeniluree (DFU), prvog identifikovanog sintetičkog citokinina. Ove supstance se odlikuju velikom stabilnošću i jakom citokiniskom aktivnošću (Mok i sar. 1982).



**Slika 4.** Hemijska struktura tidiazurona

### 1.3.2. Konjugovani oblici citokinina

Slobodne citokininske baze predstavljaju biološki aktivne forme citokinina (Yamada i sar. 2001). One mogu biti prevedene u biološki slabije aktivne ili neaktivne konjugate modifikacijom izoprenoidnog lanca koji je vezan za  $N^6$  atom adenina ili samog adeninskog prstena (**Slika 5**). Razlikuju se:

- ribozidi (ribonukleozidi) – nastaju vezivanjem riboze za  $N^9$  atom purinskog prstena; od iP, *transZ*, *cisZ* i DHZ nastaju iPR, *transZR*, *cisZR*, odnosno DHZR;
- ribotidi (ribonukleotidi) – nastaju vezivanjem ribozida preko C5' atoma riboze za jedan, dva ili tri fosfatna ostatka, formirajući ribozid-5'-monofosfate (RMP), ribozid-5'-difosfate (RDP) ili ribozid-5'-trifosfate (RTP) slobodnih baza;
- *O*-glukozidi ili *O*-ksilozidi – nastaju vezivanjem glukoze ili ksiloze za neki od atoma kiseonika bočnog lanca *transZ*, *cisZ*, DHZ, njihovih ribozida (ali ne i ribotida), ili aromatičnih citokinina (Bajguz i Piotrowska 2009; Stirk i sar. 2012);
- *N*-glukozidi – nastaju glukozilacijom atoma azota adeninskog prstena ( $N^3$ ,  $N^7$  ili  $N^9$ ) citokininskih slobodnih baza, njihovih ribozida ili ribotida (Bajguz i Piotrowska 2009);
- lupinske kiseline – nastaju vezivanjem alanina za  $N^9$  atom purinskog prstena (Duke i sar. 1978).

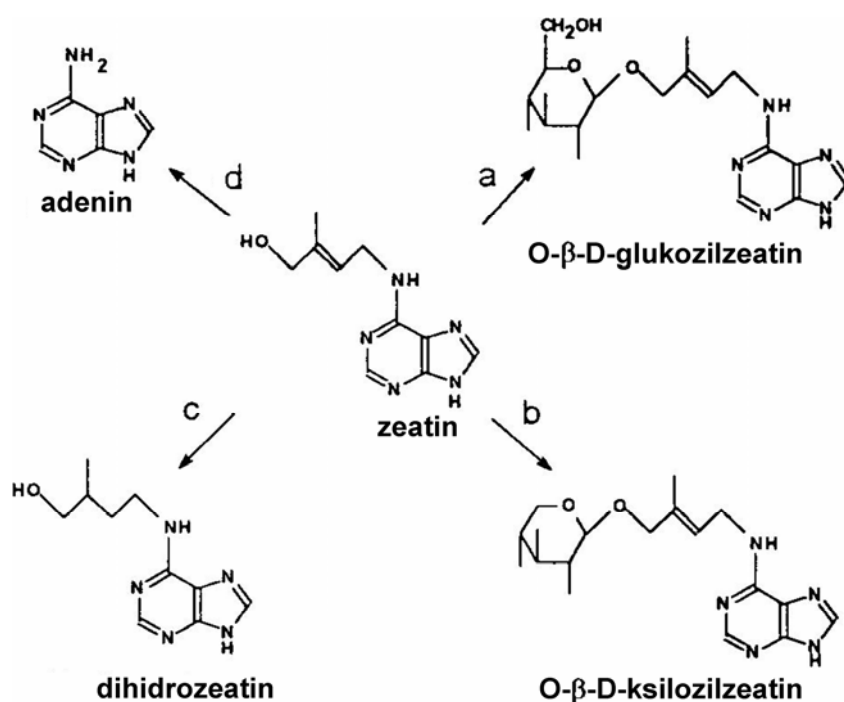
Prevođenje slobodnih citokininskih baza u ribozide, ribotide, *O*-glukozide i *O*-ksilozide predstavlja reverzibilan process (Bajguz i Piotrowska 2009), pri čemu se ove konverzije vrše delovanjem enzima *O*-glukoziltransferaze i *O*-ksiloziltransferaze (Martin i sar. 1999a; 1999b; 2001; Veach 2003; Meek i sar. 2008). Vraćanje *O*-glukozida i *O*-ksilozida u slobodnu formu vrši enzim  $\beta$ -glukozidaza (Brzobohaty i sar. 1993). Sa druge strane, *N*-glukozilacija, sa izuzetkom  $N^3$ -atoma (Kamínek i sar. 1997), je ireverzibilna, kao i konjugacija sa alaninom (Bajguz i Piotrowska 2009).



Pretpostavlja se da su ribozidi transportni oblici citokinina. Naime, smatra se da se u većini slučajeva transport citokinina vrši kroz ksilem biljke u formi *transZ*-ribozida koji se zatim u nadzemnim delovima biljke, pre svega listovima, prevode u slobodnu formu ili u glukozide. Kroz floem biljke citokinini se transportuju kao iP-ribozidi (Noodén i Lethman 1993).

*O*-glukolizacija ima važnu ulogu u skladištenju rezervi citokinina, a *O*-glukozidi su prilično stabilni, ali se isto tako po potrebi mogu lako hidrolizovati pri čemu se oslobađaju slobodne baze. Na taj način se održava stalna količina aktivnih citokinina u biljnim ćelijama (Sakakibara 2006; Bajguz i Piotrowska 2009).

Takođe, *N*-glukozidi i konjugati sa alaninom predstavljaju veoma stabilne molekule, iz kojih više ne mogu nastati slobodni citokinini. Pretpostavlja se da su oni najverovatnije oblik kojim se aktivni citokinini uklanjaju iz metabolizma, ali njihova biološka uloga nije još uvek najjasnija (Mok i Mok 2001; Hou i sar. 2004).



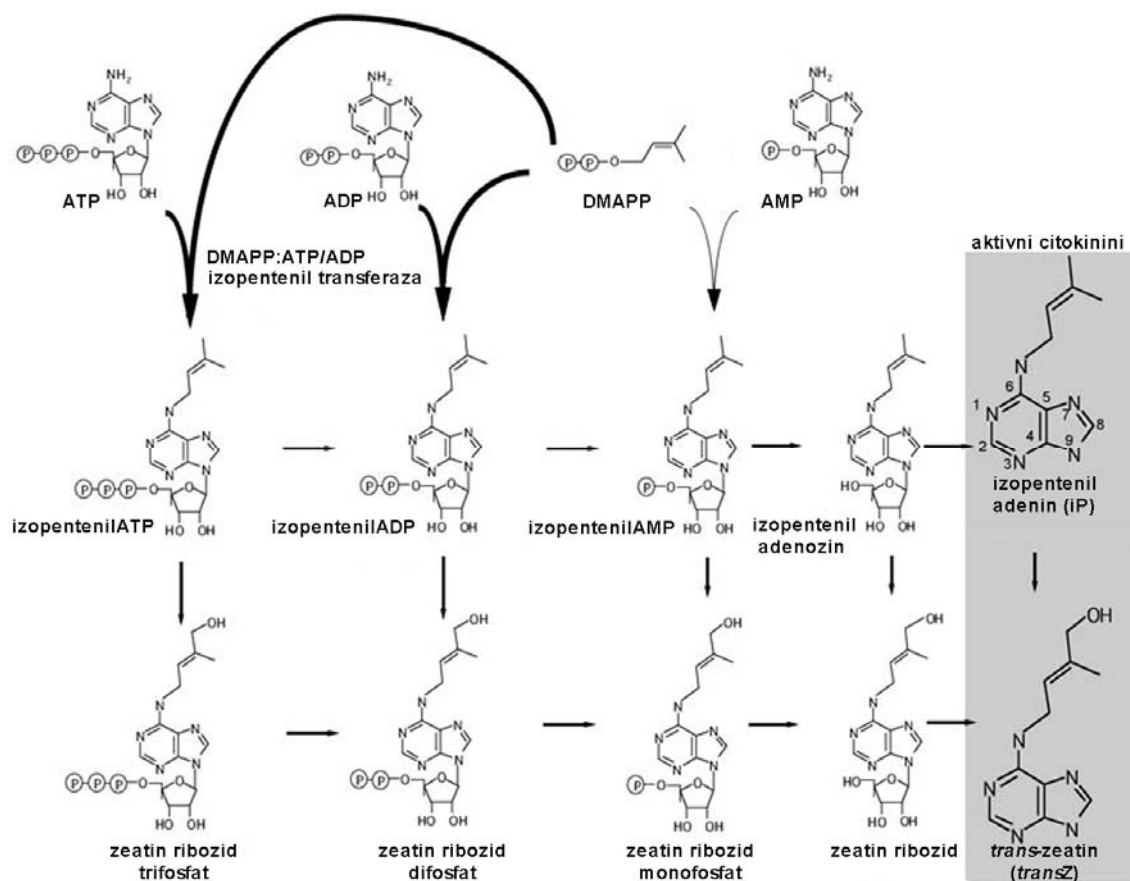
**Slika 5.** Primeri modifikacije bočnog lanca zeatina. Enzimi koji katalizuju ove procese su: *a* zeatin-*O*-glukoziltransferaza; *b* zeatin-*O*-ksiloziltransferaza; *c* zeatin reduktaza; *d* citokinin oksidaza/dehidrogenaza (Prema Mok i sar. 2000).

### 1.3.3. Biosinteza citokinina

Citokinini su otkriveni u različitim tkivima i organima viših biljaka. Njihovi nivoi u biljkama su prostorno i vremenski regulisani. Oni su prisutni u velikoj količini u vrhovima korenova, apikalnom meristemu izdanka, kao i u nezrelim semenima (Letham 1994). Iako se generalno pretpostavlja da je dominantno mesto sinteze ove klase hormona meristem korena (Noodén i Letham 1993), takođe se smatra i da kambijum, apeks izdanka i nezrela semena sintetišu citokinine (Letham 1994; Emery i sar. 2000).

Prirodni citokini su derivati purinske baze, kao što je već spomenuto, tako da je za početak njihove biosinteze neophodan nastanak adenina. Predložena su dva puta biosinteze citokinina “iP zavisni put“ (**Slika 6**) i “iP nezavisni put”.

Izopentenil transferaza (IPT) je enzim koji ima ključnu ulogu u biosintezi citokinina. Supstrat ovog enzima je DMAPP (Kakimoto 2001), izoprenoid koji nastaje kao produkt dva biosintetička puta, metil-eritritolfosfatnog puta (MEP) i mevalonatnog (MVA) puta (Ástot i sar. 2000). Smatra se da kod biljaka DMAPP koji ulazi u biosintezu citokinina preferencijalno nastaje u MEP putu, koji se dešava u plastidima (Takei i sar. 2004b; Sakakibara 2006). Izopentenil transferaza vrši transfer izopentenil-grupe sa DMAPP na  $N^6$  atom adenzin 5'-fosfata (AMP, ADP ili ATP). Ovo je prvi korak u sintezi prirodnih izoprenoidnih citokinina gde se formira ribotid biološki aktivnog citokinina iP, tj. izopentenil-adenin-ribonukleotid-monofosfat, -difosfat ili -trifosfat (iPRMP, iPRDP odnosno iPRTP) (Kasahara i sar. 2004). Nakon toga, dolazi do hidroksilacije bočnog izopentenil lanca iPRDP ili iPRTP posredstvom enzima citohrom P450 monooksigenaza (CYP735A1 i CYP735A2). To su membranski enzimi koji vrše hidroksilaciju iP-monofosfata i -difosfata ali ne i trifosfata iPRTP, slobodnih baza i nukleozida (Takei i sar. 2004b). Kao rezultat nastaje *t*ZRMP odnosno *t*ZRDP. Enzim monofosfat fosforibohidrolaza (LOG) vrši defosforilaciju iPRMP i *t*ZRMP i konvertuje ih u specifične slobodne citokininske baze (Sakakibara 2006).



**Slika 6.** Model “iP zavisnog puta“ biosinteze citokinina u biljkama (Prema Kakimoto 2003).

Pored opisanog “iP zavisnog puta“ biosinteze, *transZ* može biti sintetisan i “iP nezavisnim putem”. Naime, kao mogući izvor citokinina mogu poslužiti određene vrste tRNK koje sadrže *cis*-zeatin. Slobodne baze citokinina se nikad ne ugrađuju u tRNK, već se na njihovom budućem mestu nalazi adenin, od koga nastaje citokinin. DMAPP poreklom iz MVA puta može biti prenet na adeninski nukleotid koji je ugrađen u molekul tRNK (Kasahara i sar. 2004) ili na slobodni ADP ili ATP (Ástot i sar. 2000) u procesu koji ne podrazumeva sintezu iPRDP ili iPRTP kao intermedijera, već se *cZRDP*, odnosno *cZRTP* sintetise direktno. Detaljni koraci ovog biosintetskog puta još uvek nisu u potpunosti poznati (Stirk i sar. 2012). Kod *A. thaliana* je pokazano da se *cisZ* sintetise ovim “iP nezavisnim putem” posredstvom tRNK-IPT enzima koji kao supstrat koristi isključivo tRNK (Miyawaki i sar. 2006). Predloženi model podrazumeva i delovanje enzima zeatin-*cis-trans* izomeraze koji dalje vrši neophodnu interkonverziju *cisZ* u *transZ*, imajući u vidu slabiju biološku aktivnost *cisZ* (Takei i sar. 2004b).

Međutim, iako se dugo smatralo da ovaj enzim omogućava prelaz između *cisZ* i *transZ*, odnosno *cZR* i *tZR* i obrnuto, nedavno je pokazano da je malo verovatno da se ovakav proces odvija u biljkama *in vivo* (Gajdošová i sar. 2011).

Ključni enzim u biosintezi citokinina je prvi put identifikovan kod *Dictyostelium discoideum* (Taya i sar. 1978). Nekoliko godina kasnije gen za izopentenil-transferazu (*ipt*) je kloniran iz T-DNK *Agrobacterium tumefaciens* i pokazano je da kodira enzim sa sličnom aktivnošću, odnosno konvertuje AMP i DMAPP u iP-monofosfate (Akiyoshi sar. 1984; Barry i sar. 1984). Međutim, bakterijska izopentenil-transferaza kao supstrat za transfer izopentenil-grupe koristi AMP, a ne ADP i ATP (Kakimoto 2001). Takođe, bakterijska izopentenil-transferaza umesto DMAPP može koristiti hidrosimetilbutenil difosfat (HMBDP), čijim se transferom na molekul AMP dobija direktno *tZRMP* (Sakakibara 2006). Otkriće *ipt* gena agrobakterija vodilo je ka pretpostavci da sličan put biosinteze citokinina postoji i kod biljaka. IPT aktivnost otkrivena je takođe kod duvana (Chen i Melitz 1979), ali tek nakon sekvenciranja genoma *A. thaliana* identifikovani su homologni biljni *IPT* geni (Kakimoto 2001; Takei i sar. 2001a). Dodatno, *IPT* geni su identifikovani i kod petunije, *Petunia hybrida* (Zubko i sar. 2002) i hmelja, *Humulus lupulus* L. (Sakano i sar. 2004).

U genomu *A. thaliana* otkriveno je 9 različitih gena koji kodiraju izopentenil-transferazu označenih kao *AtIPT1-9*. Pokazano je da 7 gena (*AtIPT1* i *AtIPT3-8*) kodiraju proteine koji poseduju IPT aktivnost i učestvuju u biosintezi citokinina (Takei i sar. 2001a). Preostala dva su *AtIPT2*, koji predstavlja *tRNA-IPT* i *AtIPT9*, koji kodira protein sličan *tRNA-IPT* prisutnog kod cijanobakterija.

Mnogi *AtIPT* geni ispoljavaju određene, tkivno specifične obrasce ekspresije koji verovatno odgovaraju mestima proizvodnje citokinina (Miyawaki i sar. 2004). Dodatno, pokazano je da su različite izoforme IPT prisutne u različitim ćelijskim kompartmentima, pri čemu je ukupna količina ovih enzima najveća u plastidima. To ukazuje na to da plastidi imaju najveći značaj u biosintezi citokinina (Kakimoto 2001; Kasahara i sar. 2004).

Biosintetski put aromatičnih citokinina, kao što je BAP, je za sada nepoznat. Očigledno je da se biosinteza ove klase citokinina odvija posebnim putem koji se

razlikuje od onog opisanog za izoprenoidne citokinine (Strnad 1997) i pretpostavlja se da može biti povezan sa metabolizmom fenola (Mok i Mok 2001). Takođe, osim što učestvuju u biosintezi izoprenoidnih citokinina, monooksigenaze verovatno koriste i aromatične citokinine kao supstrate prevodeći BAP u *orto*- ili *meta*-topolin hidroksilacijom bočne benzil-grupe u *orto*- ili *meta*-položaju (Takei i sar. 2004b).

#### 1.3.4. Katabolizam citokinina

Ireverzibilna degradacija citokinina se odvija otcepljenjem bočnog izoprenskog lanca, pri čemu ostaje adenin i nezasićen aldehid 3-metil-2-butenal (Houba-Herlin i sar. 1999; Morris i sar. 1999). Time se onemogućava biološka aktivnost samih citokinina. Ova reakcija se vrši pomoću enzima citokinin oksidaze/dehidrogenaze (CKX, **Slika 5**).

Prva biljna citokinin oksidaza/dehidrogenaza izolovana je iz kukuruza (Whitty i Hall 1974). Ispostavilo se da je ovaj enzim po strukturi flavoprotein kod kojeg je kofaktor flavinadenin dinukleotid (FAD) kovalentno vezan za ZmCKX apoprotein (Schmülling i sar. 2003; Popelková i sar. 2004). *transZ*, *iP* i njihovi nukleozidi predstavljaju supstrate CKX, dok za njihove nukleotide, *O*-glukozide, *N7*-glukozide kao i DHZ i njegove conjugate, CKX nema afinitet. Takođe, *cisZ* je manje osetljiv na citokinin-oksidadnu aktivnost nego *tZ* i *iP* (Bilyeu i sar. 2001; Galuszka i sar. 2007; Stirk i sar. 2012). Iako je dugo vladalo mišljenje da CKX nema afinitet za *O*-glukozide, DHZ, aromatične citokinine i njihove derivate (Armstrong 1994; Van Staden i Crouch 1996; Bilyeu i sar. 2001), skoro je pokazano da aromatični citokinini, *N*<sup>9</sup>-glukozidi i citokininski fosfati, ipak mogu biti supstrati za CKX (Galuszka i sar. 2007).

Genom *A. thaliana* sadrži sedam gena za citokinin oksidazu/dehidrogenazu, označenih sa *AtCKX1* do *AtCKX7* (Werner i sar. 2003). Pokazano je da povećana ekspresija šest od ovih sedam gena pod kontrolom CaMV 35S promotora vodi ka smanjenju citokininskog sadržaja i kao posledicu ima pojavu izmenjenih fenotipova i kod biljaka duvana i kod *A. thaliana* (Werner i sar. 2001; 2003). Ovi fenotipovi se karakterišu sporijim rastenjem izdanaka, smanjenom veličinom listova, kasnijim cvetanjem i manjim brojem cvetova. Takođe dolazi do pojačanog rasteanja korena kao i do porasta veličine i aktivnosti apikalnog meristema korena. Pojedinačni članovi *AtCKX*

genske familije se odlikuju različitim obrascima ekspresije kako unutar same ćelije tako i u različitim tkivima biljaka (Werner i sar. 2003, 2006).

### **1.3.5. Regulacija metabolizma citokinina**

Brojna istraživanja su pokazala da se tokom različitih stadijuma razvića u biljnim tkivima ispoljava visok, ali promenljiv nivo ukupnih citokinina (Morris i sar. 1993; Benkova i sar. 1999; Dewitte i sar. 1999; Emery i sar. 2000; Yang i sar. 2001; Jacquard i sar. 2002).

Promene u nivoima citokinina su takođe vezane i za ćelijski ciklus, pri čemu su nivoi najviši u kasnoj S fazi i tokom M faze (Redig i sar. 1996). Faktori sredine takođe mogu uticati na nivoe citokinina, pri čemu postoji pozitivna korelacija sa nivoima mineralnih materija, naročito azota u formi nitrata i amonijuma (Takei i sar. 2001b, 2002; Sakakibara i Takei 2002; Miyawaki i sar. 2004). Sulfati i fosfati takođe pozitivno utiču na ekspresiju *IPT* gena (Takei i sar. 2004a), dok dehidratacija izaziva smanjenje sadržaja citokinina (Yang i sar. 2001).

Citokininska homeostaza u biljkama je određena ravnotežom između njihove biosinteze, katabolizma i modifikacija bočnih lanaca. Dakle, nivo aktivnih citokinina u biljkama se reguliše kroz kontrolisanu biosintezu, interkonverziju, transport i degradaciju. Naravno, ne treba izuzeti modifikacije bočnih lanaca koje menjaju njihovu fiziološku aktivnost. Inače, razlike u strukturi bočnih lanaca citokinina same po sebi imaju značaj jer određuju razlike u afinitetu vezivanja za receptore, a to određuje njihovu funkciju. To podrazumeva i razlike u afinitetu vezivanja za enzime koji učestvuju u njihovom metabolizmu, što određuje različit stepen njihove metaboličke regulacije (Mok i Mok, 2001; Sakakibara 2006; Bajguz i Piotrowska 2009).

Citokinini u biljkama se mogu podeliti na dva načina – po fiziološkoj funkciji (Dwivedi i saradnici 2010) i po hemijskoj prirodi (Aremu i sar. 2014a). Podela citokinina na osnovu njihove fiziološke funkcije podrazumeva postojanje četiri grupa: bioaktivne forme citokinina (slobodne baze i ribozidi), neaktivne forme citokinina ( $N^7$ - i  $N^9$ -glukozidi), forme citokinina za skladištenje (*O*-glukozidi) i citokininski nukleotidi.

Prema drugoj podeli, koja je napravljena na osnovu strukture bočnog lanca, citokinini su grupisani na *transZ*-, *cisZ*-, DHZ- i iP-tip. Odnos i zastupljenost pojedinačnih grupa u ukupnim citokininima govori o regulaciji citokininske homeostaze. Tako, nivo ukupnih citokinina može biti povišen, ali pojedinačne funkcionalne grupe, naročito bioaktivni citokinini, ne.

CKX je jedini poznati enzim koji učestvuje u katabolizmu specifičnih citokinina i tako predstavlja ključni enzim u kontroli nivoa citokinina u biljnim tkivima. Aktivnost CKX indukovana je povišenom količinom citokinina, i makar delimično povišenom količinom iRNK određenih gena koji učestvuju u njihovoj sintezi (Motyka i sar. 2003; Brugière i sar. 2003). Takođe, prilikom formiranja apikalnih meristema izdanka može doći do pokretanja biosinteze citokinina putem mehanizma pozitivne povratne sprege između biosinteze citokinina i ekspresije transkripcionog faktora STM koji ima važnu ulogu u regulaciji ćelijskog ciklusa (Jasinski i sar. 2005; Yanai i sar. 2005).

*O*-glukozilacija takođe predstavlja važan korak u metabolizmu citokinina. Prednost *O*-glukozida kao osnovne forme citokinina za skladištenje je što je ova modifikacija reverzibilna, a ipak prilično stabilna i otporna na degradaciju citokinin-oksidadom/dehidrogenazom (Veach i sar. 2003). Sa druge strane, *N*-glukozidi služe za uklanjanje aktivnih citokinina iz metabolizma. Kada su u pitanju aromatični citokini, smatra se da su enzimi i receptori koji su uključeni u procese glukozilacije kao i signalnu transdukciju isti kako za izoprenoidne, tako i aromatične citokinine (Mok i Mok 2001; Mok i sar. 2005).

Pokazano je da na metabolizam citokinina mogu uticati i drugi biljni hormoni kao što su auksini, ABA i brasinosteroidi (Brugière i sar. 2003; Takei i sar. 2004b; Yuldashev i sar. 2012). Postoje različiti podaci o uticaju auksina na aktivnost CKX. Sa jedne strane, pokazana je pozitivna regulacija određenih *AtIPT* gena (Miyawaki i sar. 2004), dok sa druge, auksini mogu i negativno regulisati biosintezu citokinina tj. porast nivoa auksina utiče na sniženje nivoa citokinina i obrnuto (Eklöf i sar. 1997; Jones i sar. 2010; Liu i sar. 2010). Auksini mogu uticati na snižavanje nivoa citokinina na dva načina: tako što stimulišu CKX aktivnost (Zhang i sar. 1995) ili onemogućavaju *de novo* sintezu citokinina (Nordström i sar. 2004). Pokazano je da ABA stimuliše ekspresiju gena koji kodira CKX kod kukuruza (Brugière i sar. 2003), dok

brasinosteroidi negativno regulišu ekspresiju i aktivnost CKX kod pšenice (Yuldashev i sar. 2012).

### **1.3.6. Specifični fiziološki efekti citokinina**

Jedna od najvažnijih uloga citokinina jeste stimulacija deobe biljnih ćelija koja se odvija u interakciji sa auksinima. Poznato je da ćelijski ciklus reguliše familija ciklin-zavisnih protein kinaza (eng. “*Cyclin Dependent Kinases*“ – CDKs) koje omogućavaju prelazak ćelije iz jedne u drugu fazu ćelijskog ciklusa fosforilacijom niza ciljnih proteina. Do aktivacije ovih CDKs dolazi kada formiraju kompleks sa malim regulatornim proteinima, ciklinima (eng. “*Cyclins*“ – CYCs). Citokinini kontrolišu sintezu određenih tipova ciklina (Berckmans i De Veylder 2009; Dong i sar. 2011). Pokazano je da citokinini stimulišu odvijanje ćelijskog ciklusa tako što povećavaju ekspresiju ključnog faktora prelaska ćelijskog ciklusa iz faze G1 u S fazu, gena *CYCD3* koji kodira ciklin D tipa (Riou-Khamlichi i sar. 1999; Dewitte i sar. 2007).

Davno je otkriveno da je odnos endogenih nivoa auksina i citokinina važan faktor prilikom usmeravanja diferencijacije biljnih ćelija u tkiva korena, odnosno izdanaka (Skoog i Miller 1965). Veća koncentracija citokinina u odnosu na auksine pospešuje rastenje izdanaka u odnosu na korenove (Sugiyama 1999; Duclercq i sar. 2011), dok višak auksina podstiče rastenje korenova u odnosu na izdanke. Werner i saradnici (2001; 2003) su pokazali da prekomerna ekspresija *AtCKX* gena u transgenim biljkama dovodi do smanjenog rasteња stabla, dok se istovremeno podstiče rastenje korenova.

Endogeni citokinini stimulišu proliferaciju ćelija u apikalnim meristemima izdanaka, dok inhibiraju funkciju apikalnog meristema korena (Kyojzuka 2007). Beemster i Baskin (2000) pokazali su da egzogeno primenjeni citokinini inhibiraju izduživanje korena biljaka smanjenjem veličine apikalnog meristema korena kao i smanjenjem broja ćelijskih deoba. Takođe, smatra se da se ova inhibicija rasteња korenova odvija posredstvom etilena koji se oslobabada pri visokim koncentracijama citokinina (Vogel i sar. 1998).



Apikalna dominacija predstavlja inhibiciju rasteanja bočnih pupoljaka pod uticajem vršnog pupoljka. Ova pojava se može prevazići lokalnom aplikacijom citokinina na bočne pupoljke i time podstaći razvijanje bočnih izdanaka. Takođe, ova uloga citokinina je potvrđena analizom transgenih biljaka *A. thaliana* koje imaju povišen nivo endogenih citokinina (Van der Graaff i sar. 2001).

Citokinini omogućavaju particiju asimilata, odnosno akumulaciju saharoze u plodovima ili skroba u tkivima za deponovanje tako što utiču na njihov transport kroz biljku (Proels i Roitsch 2009). Naime, prisustvo citokinina u određenom delu biljke utiče na usmeravanje transporta i akumulaciju asimilata u tom delu biljke.

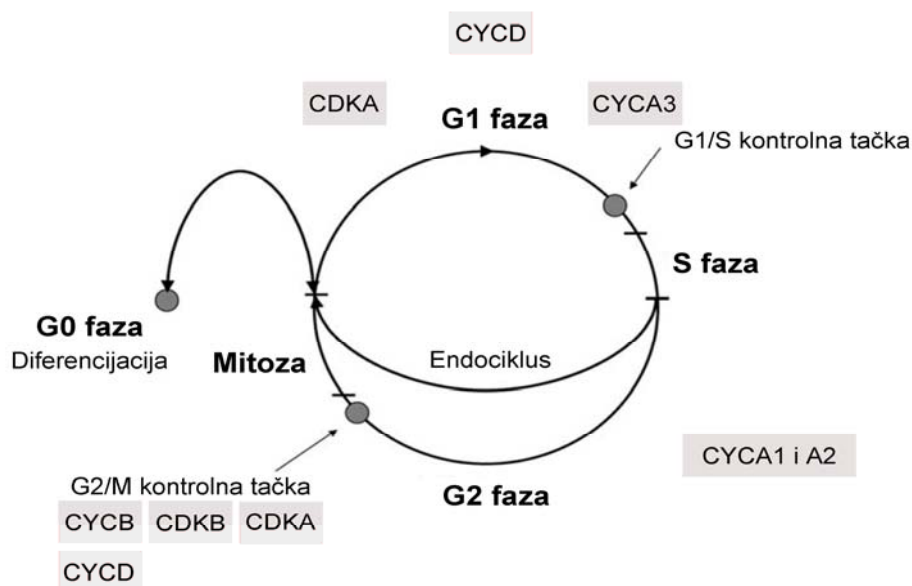
Citokinini su aktivni u najranijoj fazi sazrevanja semena, gde stimulišu ćelijske deobe i prostorno pozicioniranje embriona, a zatim nakon klijanja utiču na transport rezervnih materija, rasteanje hipokotila, korena i kotiledona (Singh i Sawhney 1992).

Senescencija je proces koji dovodi do gubitka proteina, lipida, RNK i hlorofila iz listova. Prvi simptomi senescencije su degradacija hlorofila u listovima. Pokazano je da je odlaganje senescencije zavisno od citokinina, koji usporavaju degradaciju proteina u hloroplastima i doprinose da listovi postanu atraktivni centri za akumulaciju aminokiselina i lipida (Balibrea-Lara i sar. 2004). Mladi listovi sami proizvode citokinine koji ih štite od senescencije, dok stariji listovi zavise od citokinina koji se transportuju iz korena biljke, prvenstveno *tZR* i *DHZR*. (Noodén i Letham 1993). Ključnu ulogu u odlaganju senescencije igraju određeni regulatorni geni čija aktivnost opada sa starenjem listova, što vodi početku promena vezanih za senescenciju (Ori i sar. 1999; Zwack i Rashotte 2013).

Pored navedenih, citokinini imaju još brojne fiziološke uloge u biljkama kao što su regulacija razvića vaskularnih elemenata u stablu i korenu, formiranje i rast listova, zatim utiču na reproduktivni razvoj tako što učestvuju u regulaciji pola cvetova kod nekih vrsta biljaka i deluju na diferencijaciju hloroplasta.

## 1.4. Ćelijski ciklus

Ćelijski ciklus ili ciklus mitotičke ćelijske deobe predstavlja vremenski interval koji prođe u životu jedne ćelije od njenog postanka u mitozu do kraja sledeće mitoze, kada od nje nastaju dve ćelije. Tom prilikom novonastale ćelije dobijaju jednaku količinu genetičkog materijala, odnosno DNK. Ćelijski ciklus normalno čine četiri uzastopne faze (**Slika 7**): postmitotička interfaza ili G1 faza, faza sinteze DNK ili S faza, postsintetička interfaza ili G2 faza, i mitoza, odnosno M faza (Francis i Sorrell 2001; Dewitte i Murray 2003). Mitozu čine podfaze: profaza, metafaza, anafaza i telofaza. G faze razdvajaju replikaciju DNK koja se dešava u S fazi od segregacije hromozoma u mitozu. G1 faza sledi odmah nakon mitoze i u njoj se sintetišu mnogi proteini kao i ugljeni hidrati i lipidi neophodni za rastenje ćelije. G2 faza kod većine ćelija traje kratko i u njoj dolazi do sinteze proteina neophodnih za proces mitoze, do duplikacije centriola kao i drugih organela. Takođe, faze G1 i G2 omogućavaju kontrolisanje toka ćelijske deobe u odgovoru na različite unutrašnje i spoljašnje faktore. Upravo glavne kontrolne tačke ćelijskog ciklusa jesu na prelazu G1 u S fazu i G2 u M fazu (Dewitte i Murray 2003).



**Slika 7.** Ćelijski ciklus biljaka i glavne komponente ćelijskog ciklusa. CYC–ciklin; CDK–kinaza zavisna od ciklina (Prema Hartig i Beck 2006).

Ćelijska deoba zahteva niz komplikovanih procesa koji moraju da se izvrše na vremenski i prostorno određen način. Tokom G1 faze neophodno je da ćelija ujedini sve važne signale pre nego što započne udvajanje DNK molekula. Kada započne S faza, ćelija, u najvećem broju slučajeva, nastavlja ciklus do kraja deobe. Kod nekih biljaka može doći do odvijanja alternativnog ćelijskog ciklusa, endociklusa, gde dolazi do udvajanja DNK bez mitoze (**Slika 7**). U tom slučaju dolazi do ponavljanja S i G faza bez mitoze što na kraju dovodi do endopoliploidije (Melaragno i sar. 1993; Joubes i Chevalier 2000). Takođe, ćelije mogu izaći iz ćelijskog ciklusa na prelazu između G1 i S faze, kada ostaju diploidne. Tada se ćelije nalaze u G0 fazi, iz koje ili počinju diferencijaciju ili posle nekog vremena opet mogu ući u ćelijski ciklus i nastaviti sa deobom.

#### 1.4.1. Ciklini i kinaze zavisne od ciklina

Molekularni mehanizmi koji učestvuju u kontroli ćelijskog ciklusa podrazumevaju postojanje ciklina (CYCs) i kinaza zavisnih od ciklina (CDKs), proteinskih produkata ključnih gena koji kontrolišu ćelijski ciklus i koji su konzervirani u eukariotskim organizmima (Berckmans i De Veylder 2009; Dong i sar. 2011).

Kinaze zavisne od ciklina imaju centralnu ulogu u upravljanju toka ćelijskog ciklusa. One pripadaju porodici serinskih/treoninskih protein kinaza, čija je katalitička aktivnost regulisana vezivanjem za odgovarajućeg ciklinskog partnera i to na različitim kontrolnim tačkama ciklusa (Dewitte i Murray 2003; Niuewland i sar. 2009). Aktivnost CDK/CYC kompleksa je strogo kontrolisana tokom ćelijskog ciklusa i razvića organa, a pokazano je da su neki od ovih kompleksa uključeni u upravljanje složenim ćelijskim procesima, kao što su signalna transdukcija i diferencijacija (Barrôco i sar. 2003; Montero-Cortés i sar. 2010).

Prvi CDK gen je identifikovan kod kvasca (*Saccharomyces pombe*) i označen je kao *cdc2* (eng. “*cell division cycle 2*“), a njegov proteinski produkt dobio je ime p34 na osnovu mase od 34 kD (Hindley i sar. 1984). Mnogi homologni proteini kod drugih organizama, uključujući i biljke, nazvani su *cdc2* proteini. Do danas je izolovano više od 50 ovih gena, a naziv *cdc* se odnosi na sve gene bez čijih produkata dolazi do

zaustavljanja ćelijske deobe. Biljni homolozi *cdc2* gena su nađeni kod više vrsta kao što su grašak (Feiler 1990), *A. thaliana* gde je ovaj gen označen kao *cdc2At*, tj. *CDKA;1* (Ferreira i sar. 1991), pirinač (Hashimoto i sar. 1992), kukuruz (Colasanti i sar. 1993) i soja (Miao i sar. 1993).

Dok je jedna CDK dovoljna da se izvede ćelijski ciklus kod kvasca, kod biljaka postoji veliki broj različitih kinaza zavisnih od ciklina koje funkcionišu po određenim vremenskim i prostornim obrascima. Kod *A. thaliana* postoji 29 članova CDK familije i oni su grupisani u šest grupa označenih od A do F, a tu spadaju i drugi CDK-slični proteini (Menges i sar. 2005). CDKs A tip sadrži očuvani motiv PSTAIRE, koji je prisutan i kod *cdc2* kvasca a koji predstavlja deo domena za vezivanje ciklina (Mironov i sar. 1999; Dewitte i Murray 2003). Geni koji kodiraju ova klasu CDKs se konstitutivno eksprimiraju tokom ćelijskog ciklusa, pri čemu su maksimalni nivoi uočeni na prelazu iz G1 u S i iz G2 u M fazu ciklusa (Sauter 1997; Umeda i sar. 1999). Druga klasa CDKs, CDKB, pronađena je samo kod biljaka a aktivira se vezivanjem za mitotičke cikline (Joubès i sar. 2000). Za razliku od CDKA, ekspresija CDKB se dešava isključivo tokom ćelijskog ciklusa, a transkripti se akumuliraju samo od S preko M faze ili tokom prelaza iz G2 u M fazu. Ove CDKs su dalje podeljene u dve podgrupe, CDKB1 i CDKB2. Pokazano je da je CDKB1 prisutna od S do rane M faze, dok je CDKB2 prisutna u ograničenom periodu tokom G2/M prelaza (Umeda i sar. 1999; Menges i sar. 2005). Funkcije CDKs C tipa kao i E tipa, koji su inače jedinstveni za biljke, još uvek nisu dovoljno istražene.

Ciklini su proteini koji u kompleksu sa odgovarajućom CDK određuju supstratnu specifičnost, vreme delovanja i subćelijsku lokalizaciju aktivnosti. Veliki broj biljnih ciklina je identifikovan kod različitih vrsta. Kod *A. thaliana* je pronađeno najmanje 50 ciklina grupisanih u deset tipova (Renaudin i sar 1996; Wang i sar. 2004), takođe označenih slovima alfabeta. CYCA, CYCB i CYCD su dalje podeljeni u manje grupe, označene brojevima (Renaudin i sar. 1996; Vandepoele i sar. 2002).

Različiti ciklini se eksprimiraju tokom određenih faza ćelijskog ciklusa, pri čemu svaki od njih ima određenu ulogu zajedno sa CDK u kontroli ćelijske deobe (Fobert i sar. 1994). Ovi proteini su nestabilni i za pravilan tok ciklusa je od važnosti i njihova razgradnja nakon obavljene funkcije. Ciklini A i B tipa su neophodni za ulazak

ćelija u mitozu, pa su shodno tome nazvani još i mitotički ciklini. Njihova ekspresija je zavisna od faza ćelijskog ciklusa, pa tako A tip reguliše prelaz iz S u M fazu, dok su B tipovi aktivni tokom G1/S prelaza i tokom podfaza mitoze (Lorbiecke i Sauter 1999). Dodatno, ciklini C, D i E tipa su aktivni tokom prelaza iz G1 u S fazu (Lew i sar. 1991).

Većina ciklina D tipa se karakteriše konstantnim nivoom ekspresije tokom ćelijskog ciklusa (Doonan 1998). Smatra se da ovaj tip ciklina pomaže ćelijama da iz stanja mirovanja (G0) ponovo uđu u ćelijski ciklus (Potuschak i sar. 2001). Takođe, pokazano je da se određene podgrupe CYCD eksprimiraju prvenstveno tokom prelaza iz G2 u M fazu kod duvana (Sorrell i sar. 1999) a da kod *A. thaliana* CYCDs imaju ključnu ulogu u prelazu iz G1 u S fazu (Wang i sar. 2004), što ukazuje na njihovu ulogu u regulisanje mitoze. Smatra se da oni kontrolišu tok G1 faze u odgovoru na spoljašnje i unutrašnje signale, kao što su regulatori rastjenja i hranljive materije (Soni i sar. 1995; Diehl i sar. 1997; Meijer i sar. 2000). Ciklini H tipa predstavljaju sastavnu jedinicu CDK-aktivirajućih kinaza (eng. “*CDK Activating Kinases*“ – CAKs) (Inzé 2005), dok su uloge ostalih tipova ciklina još uvek slabo razjašnjene.

Ćelijski ciklus se u biohemijskom smislu sastoji od kaskade fosforilacija i defosforilacija, koje su vremenski precizno kontrolisane (Mironov i sar. 1999). Ovi procesi pre svega podrazumevaju formiranje kompleksa CDKs i ciklina. Nakon formiranja kompleksa CDK/CYC neophodno je da dođe do fosforilacije ili defosforilacije određenih mesta kako bi stekli kinaznu aktivnost. Zhang i saradnici (1996) su prvi direktno dokazali da fosforilacija CDKs ima ulogu kontrolnog mehanizma kod biljaka. Fosforilacijom aminokiseline treonina na mestu 160 (Thr 160) dolazi do aktivacije kompleksa CDK/CYC, a kada se fosforiliše aminokiselina tirozin na mestu 15 (Tir 15) dolazi do inaktivacije kompleksa.

CDK-aktivirajuće kinaze podstiču konformacione promene na CDKs tako što ih fosforilišu, a time se dalje omogućava prepoznavanje odgovarajućeg supstrata. Kod *A. thaliana* postoje dve grupe CAKs od kojih jednu čine CDKs D tipa koji se vezuju za ciklin H (Umeda i sar. 2005) i fosforilišu i aktiviraju CDKs kao i C-terminalni domen RNK polimeraze II. Drugu grupu čine CDKs F tipa koje su nezavisne od ciklina H, a specifične su samo za kinaze zavisne od ciklina (Yamaguchi i sar. 2003).

Aktivnost CDK/CYC kompleksa podrazumeva prepoznavanje i fosforilaciju specifičnog motiva prisutnog u drugom proteinskom supstratu. Ovaj proces se odvija uz učešće ATP, a dati protein postaje aktivan u obavljanju specifičnih procesa u ćelijskom ciklusu. Različiti kompleksi fosforilišu brojne supstrate tokom prelaza iz G1 u S i G2 u M fazu, čime iniciraju replikaciju DNK i mitozu (Dewitte i sar. 2003; Menges i sar. 2005).

Inhibitori aktivnosti CDK koji su označeni kao KRPs (eng. "*KIP-Related Proteins*"), blokiraju CDK/CYC komplekse koristeći pRB/E2F (retinoblastoma protein/transkripcioni faktor E2F). Aktivnost retinoblastoma proteina zavisi od stepena fosforilacije i on poseduje više mesta za prijem fosfatnih grupa. Naime, hipofosforilacija pRB dovodi do vezivanja i inaktivacije E2F, čime se sprečava njegovo dejstvo kao transkripcionog faktora. Sa druge strane, hiperfosforilacija pRB dovodi do oslobađanja E2F čime je omogućena njegova aktivnost kao transkripcionog faktora koji učestvuje u sintezi DNK (Hartig i Beck 2006).

#### 1.4.2. Hormonalna regulacija ćelijskog ciklusa

Biljke su u značajnoj meri zavisne od faktora sredine, tako da mnogi od njih utiču na deobu meristemskih ćelija. Faktori sredine mogu uticati na ćelijski ciklus menjajući sadržaj biljnih hormona u spoljašnjem okruženju ćelija, a spoljašnji fitohormonski signali se zatim mogu brzo prevesti u unutrašnje (Hartig i Beck 2006). Odavno je poznato da su biljni hormoni auksini i citokinini neophodni za odvijanje ćelijskog ciklusa (Miller i sar. 1956), dok drugi hormoni kao što su ABA, GA, etilen, jasmonska kiselina ili brasinosteroidi imaju ulogu u adaptaciji meristemske aktivnosti na uslove sredine kao i na program razvića biljaka (Del Pozo i sar. 2005).

Auksini mogu uticati na ćelijski ciklus indirektno aktivacijom SCF (eng. "*Skp1p-Cullin-F-box complex*"), odnosno APC (eng. "*Anaphase Promong Complex*") kompleksa (Himanen i sar. 2002). Pri tome dolazi do degradacije Aux/IAA transkripcionih inhibitora, što olakšava vezivanje ARF transkripcionih faktora (Berleth i sar. 2004) i dalje ekspresiju ciljnih gena kao što su oni koji kodiraju CDKs, cikline, E2F transkripcione faktore kao i KRPs (Himanen i sar. 2002; Del Pozo i sar. 2002). Na taj

način, endogeni auksini utiču na ćelijski ciklus tako što stimulišu degradaciju inhibitornih proteina i indukciju ekspresije gena i to na prelazu iz G1 u S i iz G2 u M fazu (Blilou i sar. 2002).

Istraživanja koncentracije endogenih citokinina u kombinaciji sa analizom toka ćelijskog ciklusa pokazala su da pre svakog prelaza između faza dolazi do prolazne akumulacije citokinina, prvenstveno *transZ* ali takođe i drugih citokinina. Taj porast je praćen skoro potpunim nestankom citokinina tokom naredne faze (Hartig i Beck 2005a). Za pravilno odvijanje ćelijskog ciklusa neophodno je da dođe i do prolazne akumulacije i do smanjenja sadržaja citokinina, a ovakvo osciliranje u nivou endogenih citokinina se postiže promenama kako u biosintetskoj aktivnosti tako i u degradaciji posredstvom CKX (Hartig i Beck 2005a; 2005b). Citokinini mogu da se vežu za mesto vezivanja ATP na CDK, što ukazuje na to da oni verovatno učestvuju u fazno-specifičnoj smeni ciklina u sastavu kompleksa sa CDKs (Planchais i sar. 1997) i time u kontrolu toka ciklusa.

Pokazano je da citokinini povećavaju nivo ekspresije *CYCD3* gena koji kodira ciklin D tipa čime se vrši regulacija prelaza iz G1 u S fazu (Soni i sar. 1995; Riou-Khamlichi i sar. 1999). Povećani nivo *CYCD3* iRNK postignut je primenom citokinina i kod klijanaca i u kulturi ćelija *in vitro*. Kod *A. thaliana*, ekspresija *CYCD3* je lokalizovana u tkivima u kojima se dešavaju intenzivne ćelijske deobe, kao što su mlade lisne primordije i meristemi izdanaka. U eksperimentu koji su sprovedeli Riou-Khamlichi i saradnici (1999) zabeleženo je da prekomerna ekspresija ovog gena može nadoknaditi potrebu za citokininima u indukciji proliferacije ćelija. Ovo ukazuje na to da je glavni mehanizam kojim citokinini stimulišu ćelijsku deobu upravo povećanje ekspresije *CYCD3*. Takođe, postoje različiti podaci koji ukazuju na to da citokinini regulišu i prelazak iz G2 u M fazu (Redig i sar. 1996; Laureys i sar. 1998). Smatra se da se ovaj prelaz odvija tako što citokinini aktiviraju određeni tip fosfataza koje vrše uklanjanje inhibitorne fosfatne grupe sa odgovarajućih CDKs čime se povećava njihova aktivnost (Zhang i sar. 2005).

Citokinini u kooperaciji sa auksinima regulišu ćelijske deobe *in vitro*. Pokazano je da oni zajedno regulišu ekspresiju i aktivnost CDKA (John i sar. 1993; Mironov 1999). Iz *A. thaliana* je izolovan gen *PRZI* (*PROPORZI*) koji je neophodan za

podsticanje prelaska ćelija iz procesa proliferacije u proces diferencijacije, a njegova aktivnost zavisi od koncentracija auksina i citokinina (Sieberer i sar. 2003). Predloženo je da on funkcioniše kao “transkripcioni adapter”, koji utiče na ekspresiju regulatora ćelijskog ciklusa i tako ostvaruje svoje dejstvo na kontrolu ćelijske proliferacije.



## 2. CILJEVI RADA

1. Uspostavljanje efikasnog protokola za regeneraciju biljaka kelerabe (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes*) iz nezrelih zigotskih embriona putem procesa somatske embriogeneze *in vitro*.
2. Uspostavljanje optimalnih uslova za regeneraciju biljaka kelerabe iz različitih tipova eksplantata putem procesa *de novo* organogeneze *in vitro*.
3. Praćenje uticaja egzogeno primenjenih citokinina na homeostazu biljnih hormona kod početnih eksplantata i regeneranata kelerabe dobijenih *de novo* organogenezom.
4. Analiza obrazaca i intenziteta ekspresije gena uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa tokom *de novo* organogeneze kelerabe.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Početni biljni materijal

##### 3.1.1. Somatska embriogeneza

Za uspostavljanje *in vitro* kultura somatskih embriona kao polazni materijal korišćeni su nezreli zigotski embrioni izolovani iz nezrelih mahuna biljaka kelerabe (*Brassica oleracea* L. var. *gongylodes*) sorte Bečka Plava (BP), dobijenih zasejavanjem semena u saksije sa supstratom (60% treset, 20% humus, 20% pesak, v:v:v) i gajenih godinu dana u staklenoj bašti.

Mahune su najpre ispirane pod mlazom tekuće vode 5 minuta, nakon čega su tretirane sa 30% (v:v) rastvorom komercijalnog preparata natrijum hipohlorita (4-6% aktivnog hlora) sa dodatim 1 ml deterdženta Fairy (Procter and Gamble, London, Velika Britanija) u trajanju od 30 min. Mahune su zatim 6 puta ispirane sterilnom destilovanom vodom. Nakon sterilizacije nezreli zigotski embrioni su izolovani iz mahuna u sterilnim uslovima, pod binokularnom lupom. Zigotski embrioni su razvrstani prema dužini u različite stadijume koristeći termine upotrebljivane za opisivanje stadijuma u razvoju nezrelih zigotskih embriona kod članova porodice *Brassicaceae* (Choi i sar. 1998; Gaj 2001):

- T, stadijum torpeda: 0,5-1 mm;
- RK, rani kotiledonarni stadijum: 1-2 mm;
- K, kotiledonarni stadijum: 2-3 mm;
- KK, kasni kotiledonarni stadijum: 3-4 mm.

#### 3.1.2. *De novo* organogeneza izdanaka

Kao polazni materijal za regeneraciju biljaka kelerabe putem *de novo* organogeneze korišćena su semena dve sorte: Bečka Plava (BP) i Bečka Bela (BB).

Semena obe sorte kelerabe su površinski sterilisana potapanjem u 70% (v:v) vodeni rastvor etanola tokom 5 min. Nakon toga su sterilisana postupkom opisanim za sterilizaciju nezrelih mahuna u eksperimentu indukcije somatske embriogeneze (videti 3.1.1.) Sterilna semena su prenešena na osnovnu hranljivu podlogu u Petri kutijama (10 x 15 mm) kako bi proklijala.

Hipokotili, korenovi i kotiledoni klijanaca starih 2 nedelje su isecani na fragmente (eksplantate) dužine 5-8 mm, i postavljeni u Petri kutije sa hranjivim podlogama za indukciju *de novo* organogeneze izdanaka.

Pored navedenih odsečaka klijanaca, za indukciju *de novo* organogeneze korišćeni su i intaktni klijanci. Površinski sterilisana semena kelerabe obe sorte su direktno postavljena u epruvete sa hranjivim podlogama za indukciju *de novo* organogeneze izdanaka. Dobijeni klijanci su dalje gajeni u istim epruvetama gde je ispitivana njihova sposobnost formiranja adventivnih pupoljaka *in vitro*.

#### 3.2. Hranljiva podloga

Osnovna hranljiva podloga korišćena u ovom radu sadržala je saharozu (30 g L<sup>-1</sup>), mio-inozitol (100 mg L<sup>-1</sup>; Sigma), agar (6 g L<sup>-1</sup>; Torlak, Beograd), makro i mikro soli i kompleks gvožđa (Murashige i Skoog 1962; MS, **Tabela 1**), i vitamine (Linsmaier i Skoog 1965; **Tabela 2**). pH vrednost hranljive podloge podešavana je na 5,8 pomoću 1N rastvora NaOH neposredno pre sterilizacije. Hranljiva podloga je sterilisana u autoklavu na temperaturi od 115 °C u trajanju od 25 minuta.

**Tabela 1.** Sastav mineralnih soli MS u osnovnoj hranljivoj podlozi (Murashige i Skoog 1962)

<b>MS makro soli</b>	<b>Koncentracija (mg L<sup>-1</sup>)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>MS mikro soli</b>	<b>Koncentracija (mg L<sup>-1</sup>)</b>
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	22,30
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	8,60
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
KJ	0,83
NaMoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Kompleks gvožđa</b>	<b>Koncentracija (mg L<sup>-1</sup>)</b>
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,85
Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O	37,20

**Tabela 2.** Sastav rastvora vitamina u osnovnoj hranljivoj podlozi (Linsmaier i Skoog 1965)

<b>Vitamins</b>	<b>Koncentracija (mg L<sup>-1</sup>)</b>
vitamin B <sub>1</sub>	0,1
vitamin B <sub>6</sub>	0,5
nikotinska kiselina	0,5
glicin	2,0

U osnovnu hranljivu podlogu su dodavani odgovarajući biljni regulatori rasteња u zavisnosti od tipa eksperimenta.

Indukcija somatske embriogeneze (SE): 0, 0,5, 1 ili 1,5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D.

Efekat citokinina na formiranje sekundarnih embriona: *cisZ*, *transZ*, TDZ ili BAP u koncentraciji od 1 mg L<sup>-1</sup>.

Indukcija *de novo* organogeneze izdanaka:

\* 1 mg L<sup>-1</sup> *cisZ*;

\* 2 mg L<sup>-1</sup> *cisZ*;

\* 1 mg L<sup>-1</sup> *transZ*;

\* 2 mg L<sup>-1</sup> *transZ*;

\* 2 mg L<sup>-1</sup> TDZ;

\* 5 mg L<sup>-1</sup> BAP.

Umnožavanje regenerisanih izdanaka: 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP.

Ožiljavanje izdanaka:

\* 2 mg L<sup>-1</sup> IBA (indol-3-buterna kiselina);

\* 4 mg L<sup>-1</sup> IBA.

### 3.3. Gajenje u uslovima *in vitro*

Sve hranjive podloge, radni instrumenti kao i laboratorijski sudovi su sterilisani prema standardnim procedurama kulture biljaka *in vitro*. Rad sa biljnim materijalom vršen je u aseptičnim uslovima u laminarnoj komori (Termovent, Užice).

*In vitro* kulture su gajene u komori sa kontrolisanim uslovima na temperaturi od 25 ± 2 °C i fotoperiodu od 16 h svetlosti i 8 h mraka (uslovi dugog dana). Kao izvor svetlosti korišćene su fluorescentne lampe ("Tesla", Pančevo) jačine 65W, 4500 K i gustine svetlosnog fluksa od 47 ± 2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### 3.4. Indukcija somatske embriogeneze iz nezrelih zigotskih embriona *in vitro*

Izolovani nezreli zigotski embrioni su postavljeni u Petri kutije sa po 25 ml podloge za indukciju somatske embriogeneze. Za svaki tretman je korišćeno po 30 eksplantata svakog od četiri tipa embriona: T, RK, K ili KK. Eksperiment je ponavljen tri puta.

Nakon dve nedelje gajenja, nezreli zigotski embrioni koji su u međuvremenu prokljali, su subkultivisani na svežu podlogu istog sastava i gajeni još četiri nedelje. Formirani primarni somatski embrioni i na njima naknadno razvijeni sekundarni embrioni su odvajani od biljčica nastalih od početnih eksplantata i subkultivisani na isti tip podloge. Subkultivacija je dalje vršena svake četiri nedelje na podlozi bez regulatora rastenja, a nakon godinu dana je kod očuvanih embriogenih linija ispitivan potencijal za sekundarnu embriogenezu.

Novoformirani somatski embrioni su brojani nakon 4, 5, i 6 nedelja gajenja nezrelih zigotskih embriona na određenim podlogama u uslovima *in vitro*.

Frekvencija SE predstavljena je kao procenat onih eksplantata koji su razvili najmanje jedan somatski embrion. Intenzitet embriogeneze je izračunat kao [(ukupan broj formiranih somatskih embriona) / (broj početnih eksplantata kod kojih je indukovana SE)] u svakom tretmanu. Indeks kapaciteta formiranja somatskih embriona (eng. "*Embryo Forming Capacity*", EFC) je predstavljen formulom [(vrednost frekvencije embriogeneze) x (intenzitet embriogeneze) / 100].

#### 3.4.1. Efekat citokinina na formiranje sekundarnih embriona

Za proučavanje pojave sekundarne SE pod uticajem citokinina korišćeni su primarni somatski embrioni koji su izolovani sa iskljalih RK zigotskih eksplantata gajenih na osnovnoj hranljivoj podlozi bez 2,4-D. Po 30 primarnih somatskih embriona na globularnom (G) i kotiledonarnom (K) stadijumu razvića su prenešeni na Petri kutije sa podlogama u koje su dodati odgovarajući citokinini. Primarni somatski embrioni gajeni na podlozi bez regulatora rastenja korišćeni su kao kontrola.

Rezultati dobijeni nakon 5 nedelja gajenja su predstavljeni na isti način kao kod primarne SE. Eksperiment je ponovljen 3 puta.

#### 3.4.2. Regeneracija biljaka iz somatskih embriona i njihova aklimatizacija u uslovima staklene bašte

Pojedinačni sekundarni embrioni u kasnom kotiledonarnom stadijumu su postavljani vertikalno u staklene sudove zapremine 250 mL sa po 50 mL osnovne hranljive podloge. Nakon 5 nedelja, dobro razvijene biljčice su prenešene u staklenu baštu u saksije sa supstratom (60% treset, 20% humus, 20% pesak, v:v:v) gde su gajene u uslovima visoke vlažnosti. Biljke su se aklimatizovale tokom perioda od dve do četiri nedelje.

#### 3.5. Regeneracija kelerabe putem *de novo* organogeneze

U cilju indukcije *de novo* organogeneze izdanaka kod kelerabe kao eksplantati su korišćeni odsecci hipokotila, korenova, kotiledona, kao i intaktni klijanci.

U eksperimentima sa odseccima hipokotila, korena ili kotiledona za svaki tretman je postavljeno po 40 eksplantata istog tipa na Petri kutije sa odgovarajućom podlogom za indukciju *de novo* organogeneze izdanaka.

U slučaju semena (klijanaca) kao eksplantata, za svaki tretman citokininima korišćeno je po 20 epruveta sa odgovarajućom podlogom i jednim semenom po epruveti.

Svi eksperimenti su podrazumevali i kontrolne kulture sa odgovarajućim eksplantatima gajenim na osnovnoj hranljivoj podlozi bez regulatora rasteanja, a eksperimenti su ponovljeni 3 puta.

Stepen indukcije *de novo* organogeneze kao i broj novoformiranih adventivnih izdanaka određivan je nakon 6 nedelja. Efikasnost regeneracije, odnosno efekti različitih citokinina na organogenezu izdanaka za svaki tip eksplantata kvantifikovani su na osnovu frekvencije regeneracije i prosečnog broja izdanaka. Frekvencija regeneracije

izdanaka je računata kao [(broj eksplantata sa izdancima / ukupan broj eksplantata) x 100%], dok je prosečan broj izdanaka po eksplantatu predstavljen kao količnik broja izdanaka i broja eksplantata koji je formirao izdanke.

#### 3.5.1. Umnožavanje regenerisanih izdanaka

*De novo* regenerisani izdanci dužine 1 cm, formirani na eksplantatima hipokotila kao i na intaktnim kljancima, pažljivo su odvojeni od kalusa. Najmanje po 25 izdanaka obe sorte sa svakog citokininskog tretmana je dalje preneto na podlogu za umnožavanje izdanaka. Nakon četiri nedelje izračunat je prosečan broj formiranih bočnih izdanaka, odnosno indeks multiplikacije. Eksperiment je ponovljen tri puta.

#### 3.5.2. Ožiljavanje izdanaka i aklimatizacija biljaka u uslovima staklene bašte

Nakon umnožavanja, po 30 izdanaka obe sorte, sa svakog citokininskog pretretmana, postavljeni su na podloge za ožiljavanje u cilju formiranja adventivnih korenova. Nakon 5 nedelja vijabilne biljke sa dobro razvijenim krenom su skinute sa podloge i korenovi su isprani od ostatka podloge pod mlazom tekuće vode. Određivani su procenat ožiljenih izdanaka i fenotipske karakteristike ožiljenih izdanaka, odnosno biljaka (broj korenova po izdanku i dužina korenova, kao i visina biljaka). Eksperiment je ponovljen tri puta.

Po 30 ožiljenih izdanaka za svaku sortu je zasađeno u saksije sa supstratom (60% treset, 20% humus, 20% pesak v:v:v), i dalje gajeno u staklenoj bašti u uslovima visoke vlažnosti, do potpune aklimatizacije. Potpuna aklimatizacija je ostvarena u periodu od dve do četiri nedelje.

#### 3.6. Analiza endogenih biljnih hormona

Nivo endogenih biljnih hormona (citokinini i IAA) određivan je kod dva tipa biljnog tkiva. Odsecci hipokotila gajeni 6 nedelja *in vitro* na hranljivim podlogama sa citokininima, zajedno sa njihovim *de novo* regenerisanim izdancima, su označeni kao



“hipokotili sa regenerisanim izdancima“ (HRI). Sa druge strane, klijanci gajeni 6 nedelja *in vitro* na istim tipovima podloga zajedno sa njihovim *de novo* regenerisanim izdancima označeni su kao “klijanci sa regenerisanim izdancima“ (KRI). Eksplantati hipokotila i intaktni klijanci gajeni 6 nedelja *in vitro* na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja korišćeni su kao kontrola.

Endogeni biljni hormoni su ekstrahovani po metodi koju su opisali Dobrev i Kamínek (2002). Ekstrakcija je vršena tako što je 1 g sveže mase biljnog materijala samleven u avanu u tečnom azotu. Prah je prenet u smešu metanola, mravlje kiseline i vode (15:1:4, v:v:v), a prečišćavanje je vršeno iz čvrste faze.

Detekcija i kvantifikacija citokinina je vršena korišćenjem tečne hromatografije pod visokim pritiskom i masene spektrometrije (HPLC/MS) kao što su opisali Lexa i saradnici (2003). Korišćen je LCQ maseni spektrometar sa jonskim trapom (Finnigan Corp., San José, CA, SAD) koji funkcioniše u pozitivnom MS2 modu. Kao interni standardi za konstrukciju kalibracione krive korišćeni su odgovarajući citokinini obeleženi deuterijumom [<sup>2</sup>H]. Granica detekcije različitih citokinina kretala se između 0,5 i 1 pmol po uzorku. Koncentracije pojedinačnih citokininskih nukleotida određene su kao prirast koncentracije odgovarajućih ribozida usled defosforilacije alkalnom fosfatazom.

Koncentracija auksina (IAA) određivana je primenom dvodimenzionalne tečne hromatografije pod visokim pritiskom (2D-HPLC) po metodi koju su opisali Dobrev i saradnici (2005). Za kvantifikaciju korišćen je fluorescentni detektor LC 240 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, SAD).

Određivanje količine endogenih biljnih hormona u svakom od tri biološka uzorka ponovljeno je po četiri puta.

## 3.7. Histološka analiza

Priprema histoloških preparata izvršena je na sledeći način:

- Fiksacija uzoraka tokom 72 h na 4 °C u rastvoru FAA (eng. “*Formalin – Acetic Acid – Alchocol*“) po Jensen-u (1962):

40% prodajni formalin	10 mL
glacijana sirćetna kiselina	5 mL
70% etanol	85 mL

- Vakumska infiltracija u trajanju od 5 min.
- Dehidracija tkiva u gradijentu koncentracija etanola (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Dehidracija tkiva

Koncentracija alkohola	Dužina tretmana
50% etanol	3 x 15 minuta
70% etanol	3 x 20 minuta
96% etanol	3 x 20 minuta
100% etanol	3 x 20 minuta
ksilol : 100% etanol = 1 : 1	20 minuta
ksilol	15 minuta

- Utiskivanje dehidratiranog tkiva u Paraplast (Paraplast I tokom 24 časa, Paraplast II tokom 48 časova), nakon čega su napravljeni preseki debljine 8 µm na rotacionom mikrotomu.
- Bojenje preseka rastvorom hematoksilina (**Tabela 4**). Hematoksilinom se u ljubičasto boje celulozni ćelijski zidovi, citoplazma i jedra. Rastvor hematoksilina je pripremljen na sledeći način: 1 gr hematoksilina je rastvoren u 6 ml 100% etanola, a zatim je kap po kap dodavan u 100 ml zasićenog rastvora aluminijum amonijum sulfata. Nakon filtracije, rastvoru je dodato 25 ml glicerina i 25 ml metanola.
- Fotografisanje preparata upotrebom Leitz DMRB svetlosnog mikroskopa (Leica, Wetzlar, Nemačka).

Indukcija SE: Za histološku analizu upotrebljeni su sekundarni somatski embrioni BP kelerabe, sorta Bečka Plava, na kotiledonarnom stadijumu razvića koji su sakupljeni tri dana nakon subkultivacije na osnovnu hranljivu podlogu.

Indukcija *de novo* organogeneze izdanaka: Za histološku analizu *de novo* organogeneze izdanaka odabrani su klijanci BP kelerabe, stari 4 nedelje, kod kojih je došlo do formiranja kalusa i pupoljaka na hranljivim podlogama sa BAP, TDZ, *cis*- i *trans*-Z.

**Tabela 4.** Bojenje preparata hematoksilinom

Tretman	Dužina tretmana
ksilol I	10 min
ksilol II	10 min
100% etanol	10 min
96% etanol	10 min
70% etanol	10 min
50% etanol	10 min
destilovana voda	10 min
rastvor hematoksilina	10 min
ispiranje u tekućoj vodi	10 min
destilovana voda	5 min
50% etanol	5 min
70% etanol	5 min
96% etanol	5 min
100% etanol	5 min
ksilol I	5 min
ksilol II	5 min

### 3.8. Analiza ploidnosti regenerisanih biljaka

Ploidnost regenerisanih biljaka kelerabe određena je upotrebom tehnike protočne citometrije kod listova jednomesečnih aklimatizovanih biljaka. Testirano je 30 biljaka sorte BP dobijenih somatskom embriogenezom i po 15 biljaka obe sorte dobijenih *de novo* organogenezom iz intaktnih klijanaca. Kao kontrola u svim slučajevima su upotrebljeni listovi biljaka kelerabe gajenih iz semena u staklenoj bašti, a kao spoljašnji diploidni standard korišćeni su listovi bele deteline (*Trifolium repens* L. cv. Milo). Protočna citometrija je izvršena prema proceduri koju je opisao Otto (1988). Nukleusi su oslobođeni u 0,1 M limunskoj kiselini sa dodatkom 0,5% rastvora deterdženta Tween 20. Dobijena suspenzija nukleusa je filtrirana kroz najlonsku membranu sa porama prečnika 30  $\mu\text{m}$ . Zatim je dodat pufer za bojenje koji je sadržao 4 mg mL<sup>-1</sup> DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol) boje u 0,4 M rastvoru dinatrijum fosfata. Merenja su vršena na Partec PAS floucitometru (Partec, Minhen, Nemačka) koristeći linearnu skalu. DAPI boja je ekscitovana UV zračenjem HBO lampe na 358 nm, a emisija plave fluorescencije na 461 nm je izmerena kroz filter tipa GG 435. Približno 7000 nukleusa je korišćeno po uzorku i uradjena su najmanje četiri ponavljanja. Za izračunavanje pozicija G0/G1 maksimuma korišćen je Partec FLOMAX softver (Partec, Minhen, Nemačka).

### 3.9. Analiza ekspresije gena uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa

Promene u nivou ekspresije tri gena koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa *CDKB2;1*, *CYCB2;4* i *CYCH;1*, praćene su kod kelerabe tokom procesa *de novo* organogeneze *in vitro*. Površinski sterilisana semena kelerabe, sorta Bečka Plava, postavljena su na osnovnu hranljivu podlogu u koje je dodat po jedan od sledećih citokinina: 2 mg L<sup>-1</sup> *cisZ*, 2 mg L<sup>-1</sup> *transZ*, 2 mg L<sup>-1</sup> TDZ ili 5 mg L<sup>-1</sup> BAP. Kontrolna semena su gajena na osnovnoj hranljivoj podlozi bez citokinina. Biljni materijal (klijanci a zatim i biljke sa kalusom i *de novo* formiranim izdancima) je sakupljan u odgovarajućim vremenskim tačkama i to 7, 10, 14, 21, 28 i 35 dana nakon postavljanja semena na podloge. Tri eksplantata sa istog tretmana su činila jedan uzorak. Svi uzorci su zaleđeni u tečnom azotu i do upotrebe čuvani u zamrzivaču na -70 °C.

### 3.9.1. Izolacija ukupne RNK

Izolacija ukupne RNK iz zamrznutog materijala vršena je po modifikovanoj metodi Gašića i saradnika (2004). Ekstrakcija je vršena tako što je 0,15 g biljnog materijala najpre samleveno u avanu u tečnom azotu. Prah je zatim prenet u sterilne ependorf tubice zapremine 2 mL koje su prethodno ohlađene na ledu. Avani sa samlevenim uzorcima su dodatno isprani sa po 1,3 mL ekstrakcionog pufera (2% CTAB; 2% PVP; 0,1% DEPC; 25 mM EDTA; 100 mM TRIS-HCl pH 8; 2 M NaCl; 0,5 g L-1 spermidina; 2% β-merkaptioetanol koji je dodat neposredno pre upotrebe) prethodno zagrejanog na 60 °C, koji je zatim dodat u ependorf tubice sa prahom. Uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu na 60 °C tokom 15 min uz povremeno mešanje na vorteksu. U svaki uzorak dodato je po 650 µL smeše hloroform : izoamilalkohol (24:1, v:v) i mešano na vorteksu tokom 2 min. Nakon centrifugiranja tokom 10 min na 10000 g na +4 °C, supernatant koji se odvojio u vidu gornje, bezbojne faze, prenet je u nove ependorf tubice. Postupak sa dodavanjem smeše hloroform : izoamilalkohol i centrifugiranjem od 10 min ponovljen je još jednom.

Supernatant zapremine 500 µL odvajan je u nove ependorf tubice zapremine 2 mL, pa je zatim dodato po 166 µL hladnog 7,5 M LiCl. Sadržaj tubice je mešan okretanjem tubice gore-dole nekoliko puta i inkubiran na +4 °C preko noći.

Nakon precipitacije, sadržaj ependorf tubica je centrifugiran tokom 45 min na 12000 g na +4 °C. Supernatant je odstranjen, a talog ispran dodavanjem 300 µL hladnog 70% etanola i zatim sušen na vazduhu u laminarnoj komori tokom 5 min. Talog RNK je rastvoren dodavanjem 80 µL 0,1% DEPC, potom mu je dodato 8 µL 3M Na-acetata (pH 5,5) i 220 µL 70% etanola i inkubiran je preko noći na -70 °C. Sadržaj je ponovo centrifugiran tokom 45 minuta na 12000 g, na +4 °C. Supernatant je odlivan, a talog sušen u laminarnoj komori tokom 10 min i zatim resuspendovan dodavanjem 200 µL 0,1% DEPC, nakon čega je čuvan na -70 °C.

### 3.9.2. Provera kvaliteta i kvantifikacija izolovane RNK

Kvalitet izolovane RNK proveravan je elektroforezom na agaroznom gelu. Elektroforeza je vršena na 1,2% agaroznim gelovima sa  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  etidijum-bromida u 1 x TBE puferu (**Tabela 5**), pri konstantnom naponu od 75 V. Elektroforeza RNK se odvijala u aparatu za horizontalnu elektroforezu BlueMarine 100 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka). Posle završene elektroforeze gelovi su prosvetljivani na talasnoj dužini od 266 nm i fotografisani u transiluminatoru (UltraLum Inc, Gel Explorer, Exton, PA, SAD). Kvalitet RNK određivan je i spektrofotometrijski (Agilent 8453, Santa Clara, CA, SAD) prema odnosu  $A_{260}/A_{280}$  (za čistu RNK  $A_{260}/A_{280}$  iznosi 1,9-2,1).

Kvantitet izolovane RNK izračunavan je prema formuli:

$$[\text{ukupna RNK}] = 40 \mu\text{g mL}^{-1} \times A_{260} \times \text{razblaženje}$$

**Tabela 5.** Sastav 1 x TBE pufera za elektroforezu RNK

Komponenta	Količina (za 1L TBE pufera)
Tris (hidroksimetil) aminometan (Serva)	10,8 g
Borna kiselina (Duchefa)	5,5g
0,5M EDTA (pH 8)	4,0 mL
Etidijum-bromid (Valeant Pharmaceuticals, Montreal, Kanada)	0,5 mg

### 3.9.3. Prečišćavanje uzoraka RNK od kontaminacije sa DNK

Pre reakcije reverzne transkripcije (RT) po  $2 \mu\text{g}$  totalne RNK iz svakog uzorka je tretirano DNK-azom (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, SAD). Ovaj tretman je vršen u reakcionoj smeši zapremine  $10 \mu\text{L}$  (**Tabela 6**).

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

Komponenta reakcione smeše	Količina
totalna RNK	2,00 µg
10 x pufer za DNK-azu (Thermo Scientific)	1,00 µL
DNK-aza	1,00 µL
inhibitor RNK-aze (Thermo Scientific, 40 U / µL)	0,25 µL
H <sub>2</sub> O	7,75 µL
Ukupna zapremina reakcione smeše	10,00 µL

Tretman DNK-azom odvijao se tokom 30 minuta, na 37 °C, a potom je DNK-aza inaktivirana zagrevanjem uzoraka u koje je dodat po 1 µL EDTA (Thermo Scientific) na 65 °C tokom 10 minuta.

#### 3.9.4. Reverzna transkripcija (RT)

Reverzna transkripcija RNK u jednolančanu DNK (cDNK) vršena je u PCR mašini Eppendorf Mastercycler nexus gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka), pomoću RevertAid™ reverzne transkriptaze (Thermo Scientific) i odvijala se u tri koraka: 25 °C (10 min), 42 °C (60 min) i zatim 72 °C (10 min). Reakciona smeša zapremine 20 µL sastojala se od komponenti prikazanih u **Tabeli 7**.

**Tabela 7.** Sastav reakcione smeše za reverznu transkripciju

Komponenta reakcione smeše	Količina
5 x RT-PCR pufer (Thermo Scientific)	4,0 µL
10 mM dNTP (Applied Biosystems)	2,0 µL
100 µM nasumični heksameri (Thermo Scientific)	1,0 µL
inhibitor RNK-aze	0,5 µL
RevertAid™ reverzna transkriptaza	1,0 µL
H <sub>2</sub> O	9,0 µL
RNK (0,2 µg µL <sup>-1</sup> )	2,5 µL
Ukupna zapremina reakcione smeše	20,0 µL

Dobijena cDNK je dalje korišćena u PCR reakciji za proveru specifičnosti prajmera, za dobijanje standarda za apsolutnu kvantifikaciju i u qPCR reakciji.

### 3.9.5. PCR reakcija

PCR reakcije su se odvijale po sledećem protokolu:

1. Početna denaturacija DNK (95 °C, 5 min)

2. 40 ciklusa:

a) Denaturacija (95 °C, 30 s)

b) Vezivanje prajmera (53 °C, 1 min)

c) Ekstenzija (72 °C, 1 min)

3. Finalna ekstenzija (72 °C, 10 min)

Sve PCR reakcije sa specifičnim prajmerima urađene su pomoću GeneAmp® Gold PCR Reagent Kit-a (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, SAD) i odvijale su se u PCR mašini Eppendorf Mastercycler nexus gradient. Svaka PCR reakcija se odvijala u reakcionoj smeši zapremine 25 µL (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Sastav reakcione smeše za pojedinačnu PCR reakciju

Komponenta reakcione smeše	Količina
10 x PCR pufer	1,50 µL
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0,75 µL
10 mM dNTP	1,00 µL
5µM Prajmer F	1,25 µL
5µM Prajmer R	1,25 µL
5 U µL <sup>-1</sup> AmpliTaq Gold® DNK polimeraza	0,25 µL
H <sub>2</sub> O	17,00 µL
cDNK (0,05 µg µL <sup>-1</sup> )	2,00 µL
Ukupna zapremina reakcione smeše	25,00 µL



Vizualizacija amplifikovanih fragmenata vršena je pomoću elektroforeze na agaroznom gelu, čiji je opis dat u odeljku 3.9.2.

Sekvence prajmera ("Forward" i "Reverse") koji su korišćeni za amplifikaciju fragmenata gena kelerabe *CDKB2;1*, *CYCB2;4* i *CYCH;1* u PCR reakcijama prikazani su u **Tabeli 9**. Prajmeri odgovaraju datim genima koji su uključeni u ćelijski ciklus *A. thaliana*, a koji se nalaze u bazi podataka GenBank™. Radi provere ujednačenosti količine ukupne cDNK, u svim uzorcima, paralelno sa amplifikacijom tri gena ćelijskog ciklusa, amplifikovan je i referentni gen za aktin krompira, *Solanum tuberosum* L. (*PoAc58*). Prajmeri korišćeni za amplifikaciju aktinskog gena prikazani su takođe u **Tabeli 9**.

**Tabela 9.** Sekvence prajmera korišćenih u PCR i qPCR reakcijama

Gen	GenBank™ pristupni br.	Sekvenca prajmera	Očekivana dužina amplikona
<i>CDKB2;1</i>	NM_106304	F: 5'-GTACGAGCCAGCGAAACGAA-3'	170 bp
		R: 5'-GCAGCACACTAGAGATATGCTTGA-3'	
<i>CYCB2;4</i>	NM_106281	F: 5'-GCATCGGCGATCTACACTGC-3'	141 bp
		R: 5'-CCCTGCCTTGTGATGCAAAC-3'	
<i>CYCH;1</i>	NM_122644	F: 5'-CTCCTCTTTCCTCCTGGCCA-3'	125 bp
		R: 5'-GTCGTGTGCTCAGAGTTCGG-3'	
<i>PoAc58</i>	X55749	F: 5'-TGTTGGACTCTGGTGATGGTG-3'	141 bp
		R: 5'-AGTAACCACGCTCAGTGAGGA-3'	

Specifičnost prajmera potvrđena je upoređivanjem dobijene dužine amplikona sa očekivanim dužinama RT-PCR produkata dobijenih nakon gel elektroforeze (Dmitrović i sar. 2015) i analizom krive topljenja posle qPCR reakcije.

Produkti RT-PCR amplifikacije za sva 4 gena, koji su dobijeni upotrebom specifičnih prajmera kod kelerabe, izolovani su sa agaroznog gela. Sekvenciranje dobijenih produkata je izvršeno od strane MacroGen Inc (Amsterdam, Holandija) radi provere stepena homogenosti sa sekvencama odgovarajućih gena iz *A. thaliana*, odnosno

krompira. Za upoređivanje sekvenci korišćen je softver Geneious R8 (<http://www.geneious.com>, Kears e i sar. 2012) i BLAST (eng. “*Basic Local Alignment Search Tool*“) metoda (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### 3.9.6. Standardi za apsolutnu kvantifikaciju ekspresije gena

Za apsolutnu kvantifikaciju ekspresije gena napravljeni su standardi od cDNK fragmenata svakog od četiri gena amplifikovanih pomoću klasičnih PCR reakcija sa specifičnim prajmerima iz **Tabele 9**.

Fragmenti cDNK su izolovani sa agaroznog gela koristeći GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) prema metodi Boom-a i saradnika (1990) koja se sastoji iz sledećih koraka:

- Odsecanje traka na gelu, koje su bile uočljive pri UV osvetljenju, i ubacivanje u ependorf tubice, u koje je dodat vezujuć i pufer u odnosu 1:1 (v:m).
- Inkubacija sadržaja u ependorf tubicama u vodenom kupatilu na 56 °C tokom 10 min do potpunog rastvaranja.
- Dodavanje 100% izopropanola sadržaju u ependorf tubicama u odnosu 1:2 (v:v). Nakon snažnog mešanja, sadržaj je sipan u kolone za filtriranje i centrifugiran (11000 g, 1 min). Dobijeni filtrat je odstranjen nakon čega je dodato je 700 µL pufera za ispiranje.
- Centrifugiranje (11000 g, 1 min) nakon čega su filtrati odstranjeni, a ependorf tubice sa kolonama su ponovo centrifugirane kako bi se kompletno odstranili ostaci pufera za ispiranje.
- Prebacivanje sadržaja u nove ependorf tubice u koje je dodato 50 µL elucionog pufera i centrifugiranje tokom 1 min na 11000 g. Dobijeni filtrati, koji su sadržali produkte RT–PCR amplifikacije iz agaroznog gela, su čuvani na -20°C.

Kvantitet prečišćenih cDNK fragmenata određivan je na spektrofotometru Agilent 8453 i izračunavan prema formuli:

[ukupna DNK] =  $50 \mu\text{g mL}^{-1} \times A_{260} \text{ nm} \times \text{razblaženje}$

Nakon spektrofotometrijske kvantifikacije, izračunat je broj DNK kopija (<http://endmemo.com/bio/dnacopynum.php>) i napravljena je serija razblaženja za sve amplifikovane gene (od  $10^9$  do  $10^2$  kopija DNK po  $1 \mu\text{L}$ ). Za qPCR reakciju uzimano je po  $1 \mu\text{L}$  standarda za svaki gen.

### 3.9.7. Kvantitativna PCR reakcija (qPCR)

qPCR reakcija sa cDNK kelerabe se odvijala u smeši finalne zapremine  $25 \mu\text{L}$  (Tabela 10), pri čemu su korišćeni prajmeri iz Tabele 9. q-PCR analiza je rađena pomoću Maxima SYBR Green/ROX Kit-a (Thermo Scientific) po uputstvima proizvođača. Maxima SYBR Green/ROX Master Mix je smeša DNK polimeraze (Taq), dNTP-ova, fluorescentno zelene boje SYBR Green I i referentne boje ROX u odgovarajućem PCR puferu. DNK polimeraza Taq rastvorena u puferu daje osetljivu i specifičnu PCR amplifikaciju. Boja SYBR Green I osigurava detekciju, a samim tim i analizu DNK. Boja ROX je pasivna referentna fluorescentna boja koja služi za normalizaciju varijacija između reakcija kao i grešaka u pipetiranju. Ova boja se ne vezuje za DNK i ima konstantnu fluorescenciju tokom reakcije.

**Tabela 10.** Sastav smeše za pojedinačnu q-PCR reakciju

Komponenta reakcione smeše	Količina
SYBR Green I Master Mix	12,5 $\mu\text{L}$
5 $\mu\text{M}$ Prajmer F	1,5 $\mu\text{L}$
5 $\mu\text{M}$ Prajmer P	1,5 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	7,0 $\mu\text{L}$
cDNK ( $12,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ )	2,5 $\mu\text{L}$
Ukupna zapremina reakcione smeše	25,0 $\mu\text{L}$

Sve qPCR reakcije su se odvijale po sledećem protokolu:

1. Početna denaturacija cDNK ( $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min)

2. 40 ciklusa:

- a) Denaturacija (95 °C, 30 s)
- b) Vezivanje prajmera (56 °C , 1 min za *CDKB2;1*, odnosno 53 °C, 1 min za *CYCB2;4*, *CYCH;1* i *PoAc58*)
- c) Ekstenzija (72 °C, 1 min)

3. Finalna ekstenzija (72 °C, 10 min)

4. Analiza krive topljenja

Sve qPCR reakcije urađene su u tri tehnička ponavljanja u aparatu ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

#### 3.9.8. Analiza podataka u qRT-PCR metodi

SYBR Green boja je nakon vezivanja za dvolančanu DNK uzorka emitovala karakterističan fluorescentni signal koji je detektovan pomoću qPCR aparata. Ct (“*threshold cycle*”) vrednost, tj. broj ciklusa u kome je fluorescencija uzoraka dostizala prag “fluorescentnog šuma” koji je poticao od nespecifične fluorescencije, određivana je automatski, pomoću programa 7000 System SDS Software.

Standardne krive, koje pokazuju zavisnost Ct vrednosti od logaritma broja kopija matrice u standardnim razblaženjima, korišćene su za izračunavanje broja kopija transkripta u uzorcima. Korišćenjem metode  $\Delta\Delta C_t$  određena je relativna kvantifikacija količine transkripata u uzorcima kelerabe koji su bili tretirani citokininima u odnosu na kontrolu, za svaku vremensku tačku.

Tačke topljenja amplikona ( $T_m$ ) su definisane kao temperature na kojima je prelaz iz dvolančane u jednolančanu formu najbrži. Analiza krive topljenja je poslužila za analizu specifičnosti amplifikacije odgovarajućih gena kod ispitivanih uzoraka.

#### 3.10. Statistička obrada podataka i grafičko predstavljanje rezultata

Numerički podaci su obrađeni primenom računarskog programa SAS Version 9.0 (SAS Institute, 2002. SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC.). Za određivanje

statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti korišćena je analiza varijanse (ANOVA) i LSD (eng. "*Least Significant Difference*") test za utvrđivanje statistički značajnih razlika na nivou  $p \leq 0,05$ .

Podaci izraženi u procentima su angularno transformisani u cilju statističke obrade i reverzno transformisani inverznom funkcijom radi tabelarnog ili grafičkog prikaza.

Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je pomoću računarskog programa Origin 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, SAD). Srednje vrednosti prikazane su sa odgovarajućom standardnom greškom. Na graficima su prikazani i rezultati analiza statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti i to slovima. Istim slovima su označene vrednosti koje se međusobno statistički značajno ne razlikuju.

#### **3.10.1. Indukcija somatske embriogeneze**

Prilikom obrade podataka dobijenih iz eksperimenata vezanih za indukciju somatske embriogeneze korišćena je dvofaktorijalna ANOVA, gde su analizirani faktori bili tip eksplantata i podloga za indukciju.

#### **3.10.2. Regeneracija kelerabe putem *de novo* organogeneze**

U obradi rezultata koji se odnose na *de novo* organogenezu izdanaka, uključujući i endogeni sadržaj citokinina i IAA, korišćena je dvofaktorijalna ANOVA gde su tip eksplantata i tretman predstavljali analizirane faktore. Dvofaktorijalna ANOVA je takođe korišćena prilikom analize podataka dobijenih u eksperimentu ožiljavanja regenerisanih izdanaka, gde su sastav podloge za indukciju izdanaka i primenjena koncentracija IBA bili faktori. Za obradu podataka ustanovljenih tokom eksperimenta umnožavanja regenerisanih izdanaka, upotrebljena je jednofaktorijalna ANOVA, a kao faktor je analizirana samo podloga za indukciju *de novo* izdanaka.

### **3.10.3. Analiza ekspresije gena uključenih u ćelijski ciklus**

Dvofaktorijalna ANOVA je korišćena prilikom obrade podataka detektovanih tokom praćenja ekspresije gena ćelijskog ciklusa. Analizirane faktore u slučaju relativnih vrednosti transkripata *CDKB2;1*, *CYCB2;4* i *CYCH;1* gena predstavljali su vremenski interval i tip tretmana, dok su za obradu podataka kod apsolutnih kontrolnih vrednosti faktori bili vremenski interval i dati geni.

## **4. REZULTATI**

### **4.1. Somatska embriogeneza**

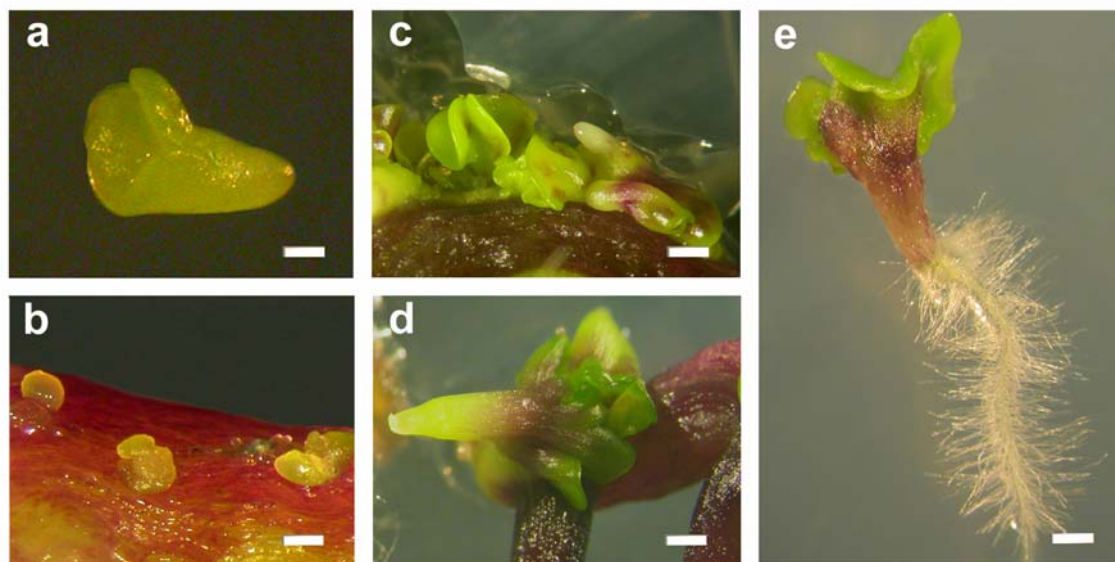
#### **4.1.1. Formiranje somatskih embriona**

Za indukciju somatske organogeneze kod kelerabe korišćeni su nezreli zigotski embrioni u različitim stupnjevima razvića: torpedo, rani kotiledonarni, kotiledonarni i kasni kotiledonarni. Početni eksplantati su gajeni na podlogama sa različitim koncentracijama 2,4-D, kao i na osnovnoj hranljivoj podlozi.

U toku četiri nedelje gajenja na osnovnoj hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja, nezreli zigotski embrioni BP kelerabe u ranom kotiledonarnom (**Slika 8a**), kotiledonarnom i kasnom kotiledonarnom stadijumu razvili su se u biljčice dužine od 1,5 do 3 cm sa dobro definisanim korenovima i izduženim hipokotilima, noseći na svojoj površini novoformirane primarne somatske embrione. Nasuprot njima, eksplantati u torpedo stadijumu su isključili u defektne biljčice sa kratkim i debelim hipokotilima, zavijenim listovima i sa blagim kalusnim proširenjem u bazi hipokotila. Ove biljčice su takođe na svojoj površini nosile novoformirane somatske embrione. To je ukazalo da je kod svih tipova početnih eksplantata gajenih na osnovnoj hranljivoj podlozi došlo do spontane pojave somatskih embriona (**Tabela 11**).

Prisustvo 2,4-D u podlozi dovelo je do nepravilnog razvoja i deformacije svih eksplantata nezavisno za njihov stadijum razvića. Na nižim koncentracijama 2,4-D ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) eksplantati su bili deformisani, sa uočljivom radikulom i pojavom kalusa u osnovi kratkih i zadebljanih hipokotila. Stepem deformisanosti eksplantata rastao je sa povećanjem koncentracije 2,4-D do kompletne malformacije eksplantata gajenih na  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D. Somatski embrioni su se formirali i na eksplantatima gajenim na 2,4-D, ali sa manjom učestalošću u odnosu na one gajene na podlozi bez biljnih regulatora rastenja (**Tabela 11**).

U skoro svim slučajevima, somatski embrioni su se formirali direktno na eksplantatu bez posredne kalusne faze (**Slika 8b**). Kompaktan kalus se mogao uočiti samo kod manjeg broja eksplantata gajenih na većim koncentracijama 2,4-D.



**Slika 8.** Indukcija somatske embriogeneze kod nezrelih zigotskih embriona kelerabe, sorta Bečka Plava, gajenih na osnovnoj hranljivoj podlozi. (a) Nezreli zigotski embrion u ranom kotiledonarnom stadijumu, *bar* = 0,3 mm; (b) Globularni embrioni formirani na površini eksplantata, *bar* = 0,8 mm; (c) primarni somatski embrioni u različitim stadijumima razvića nakon četiri nedelje gajenja, *bar* = 3 mm; (d) zreli kotiledonarni somatski embrion, *bar* = 1,5 mm; (e) Isklijali primarni somatski embrion, *bar* = 3 mm.

Primarni somatski embrioni u globularnom stadijumu razvića su se formirali nakon različitog vremenskog perioda gajenja početnih eksplantata na podlozi bez regulatora rasteња, tako da su se kod KK javili nakon 7 dana, kod K nakon 10 dana, kod RK nakon 12 i kod T nakon 18 dana gajenja. Noviformirani embrioni bili su svetlo zelene boje i lako su se razaznavali na površini eksplantata (**Slika 8b**). Do kraja 28. dana, globularni somatski embrioni na eksplantatima su se razvili do različitih stadijuma razvića (**Slika 8c,d**). U skoro svim slučajevima, somatski embrioni su formirani direktno na eksplantatu bez posredne kalusne faze. Kompaktan kalus se mogao uočiti samo kod manjeg broja eksplantata gajenih na većim koncentracijama 2,4-D.



**Tabela 11.** Embriogeni odgovor nezrelih zigotskih embriona kelerabe, sorta Bečka Plava, nakon 4, 5 i 6 nedelja gajenja na osnovnoj hranljivoj podlozi i podlogama sa različitim koncentracijama 2,4-D

Stadijum razvika nezrelog zigotskog embriona	Koncentracija 2,4-D (mg L <sup>-1</sup> ) u hranljivoj podlozi	Nakon 4 nedelje		Nakon 5 nedelja		Nakon 6 nedelja	
		Frekvencija embriogeneze (%) ± S.E.*	Intenzitet embriogeneze ± S.E.**	Frekvencija embriogeneze (%) ± S.E.*	Intenzitet embriogeneze ± S.E.**	Frekvencija embriogeneze (%) ± S.E.*	Intenzitet embriogeneze ± S.E.**
Torpedo	0	53,31 ± 0,37 ab	3,87 ± 0,52 cd	60,64 ± 1,48 b	4,79 ± 0,49 cd	86,01 ± 43,95 ab	6,25 ± 0,79 c
	0,5	0,00 ± 0,00 f	0,00 ± 0,00 e	13,88 ± 4,03 cd	1,26 ± 0,14 de	13,94 ± 4,05 cde	2,29 ± 0,42 c
	1,0	13,88 ± 4,03 de	2,00 ± 0,18 de	26,19 ± 0,52 c	1,73 ± 0,16 de	32,92 ± 0,53 c	2,44 ± 0,34 c
	1,5	2,40 ± 2,40 def	3,03 ± 0,46 cde	2,40 ± 2,40 d	3,98 ± 0,27 cde	2,40 ± 2,40 e	3,96 ± 0,51 c
Rani kotiledonarni	0	80,69 ± 0,52 a	8,15 ± 1,08 a	83,55 ± 0,15 ab	9,67 ± 1,26 a	86,88 ± 0,16 ab	18,57 ± 2,57 a
	0,5	19,32 ± 0,54 cd	4,21 ± 0,72 cd	23,18 ± 0,09 c	4,21 ± 0,84 cde	23,25 ± 0,11 cde	5,32 ± 1,02 c
	1,0	16,38 ± 0,23 de	1,96 ± 0,45 de	16,44 ± 0,21 cd	3,23 ± 0,66 de	16,42 ± 0,18 cde	4,73 ± 0,93 c
	1,5	0,00 ± 0,00 f	0,00 ± 0,00 e	1,11 ± 1,11 d	1,00 ± 0,00 e	2,40 ± 2,40 e	2,04 ± 0,31 c
Kotiledonarni	0	74,64 ± 1,21 ab	5,76 ± 0,68 bc	90,71 ± 2,41 a	7,65 ± 0,87 ab	95,47 ± 1,07 a	13,78 ± 1,89 b
	0,5	2,40 ± 2,40 def	1,53 ± 0,23 de	9,29 ± 2,41 cd	2,00 ± 0,18 de	11,63 ± 3,06 cde	2,61 ± 0,55 c
	1,0	1,11 ± 1,11 ef	1,00 ± 0,00 de	4,54 ± 1,12 cd	1,00 ± 0,00 e	12,96 ± 0,25 cde	1,54 ± 0,08 c
	1,5	4,54 ± 1,12 def	2,49 ± 0,24 de	4,54 ± 1,12 cd	2,52 ± 0,16 de	4,54 ± 1,12 de	2,52 ± 0,16 c
Kasni kotiledonarni	0	46,52 ± 0,77 bc	7,53 ± 1,32 ab	63,47 ± 0,49 b	7,62 ± 1,59 ab	70,28 ± 0,43 b	13,71 ± 2,68 b
	0,5	8,75 ± 2,83 def	1,72 ± 0,35 de	26,19 ± 0,52 c	1,72 ± 0,35 de	26,19 ± 0,52 cd	3,17 ± 0,46 c
	1,0	1,11 ± 1,11 ef	1,00 ± 0,00 de	1,11 ± 1,11 d	1,00 ± 0,00 e	6,67 ± 1,89 cde	2,26 ± 0,44 c
	1,5	2,40 ± 2,40 def	1,00 ± 0,00 de	6,67 ± 1,89 cd	1,00 ± 0,00 e	6,67 ± 1,89 cde	1,00 ± 0,00 c

Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti p ≤ 0,05.

\* Frekvencija embriogeneze: procenat eksplantata koji su formirali najmanje jedan somatski embrion.

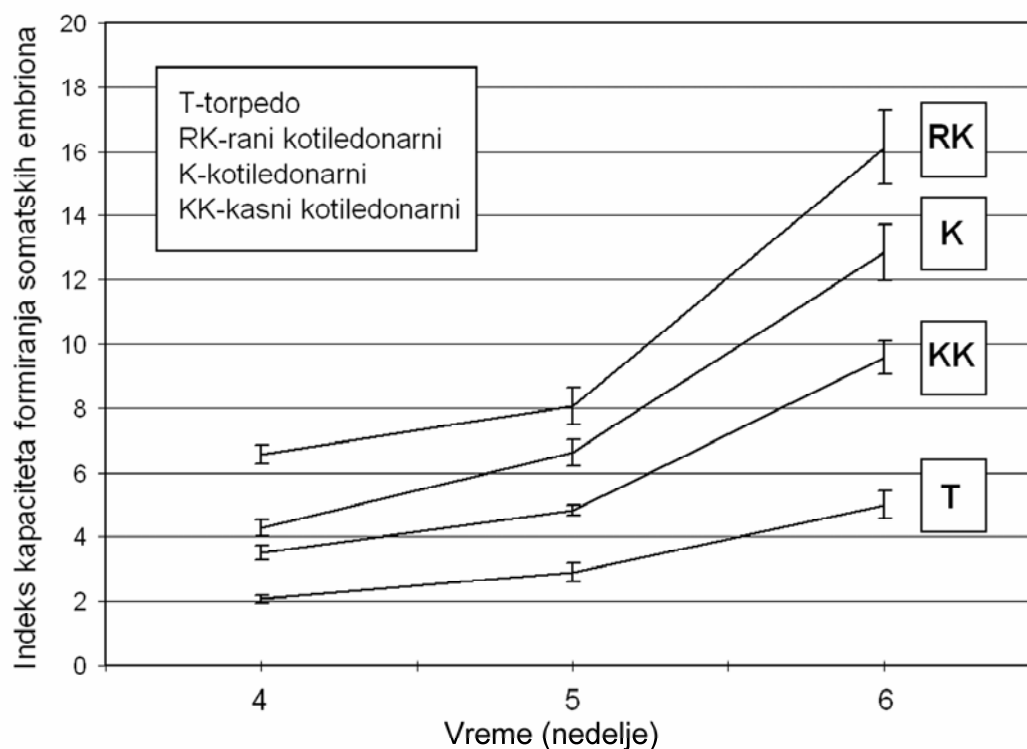
\*\* Intenzitet embriogeneze: srednja vrednost broja somatskih embriona formiranih po eksplantatu.

Različite koncentracije 2,4-D, u hranljivim podlogama su imale statistički značajan uticaj na frekvenciju somatske embriogeneze nakon četiri nedelje gajenja eksplantata u kulturi (**Tabela 11**). Takođe, postojala je interakcija koncentracije 2,4-D i stadijuma razvića početnih eksplantata u indukciji somatske embriogeneze. Najbolji odgovor kod sva četiri tipa eksplantata je zabeležen kada su bili gajeni na hranljivoj podlozi bez biljnih regulatora rasteња, pri čemu je najveća frekvencija somatske embriogeneze nakon četiri nedelje dobijena kod eksplantata u ranom kotiledonarnom (80,7%) i kotiledonarnom (74,6%) stadijumu. Dodavanje auksina 2,4-D u hranljivu podlogu imalo je inhibitorski efekat na somatsku embriogenezu, snižavajući frekvenciju somatske embriogeneze na 0-19 %.

Oba analizirana faktora, koncentracija 2,4-D i stadijum razvića početnih eksplantata, značajno su uticali i na intenzitet somatske embriogeneze, a postojala je i interakcija između njih (**Tabela 11**). Najveći prosečan broj primarnih somatskih embriona po eksplantatu nakon četiri nedelja gajenja na osnovnoj hranljivoj podlozi zabeležen je za rani (8,2) i kasni kotiledonarni (7,5) stadijum. Eksplantati gajeni na podlozi sa 2,4-D su imali značajno manji intenzitet embriogeneze.

I nakon 5 nedelja gajenja u kulturi, oba faktora su imala uticaj na frekvenciju somatske embriogeneze, ali nakon 6 nedelja, efekat stadijuma razvića početnih eksplantata je izostao (**Tabela 11**).

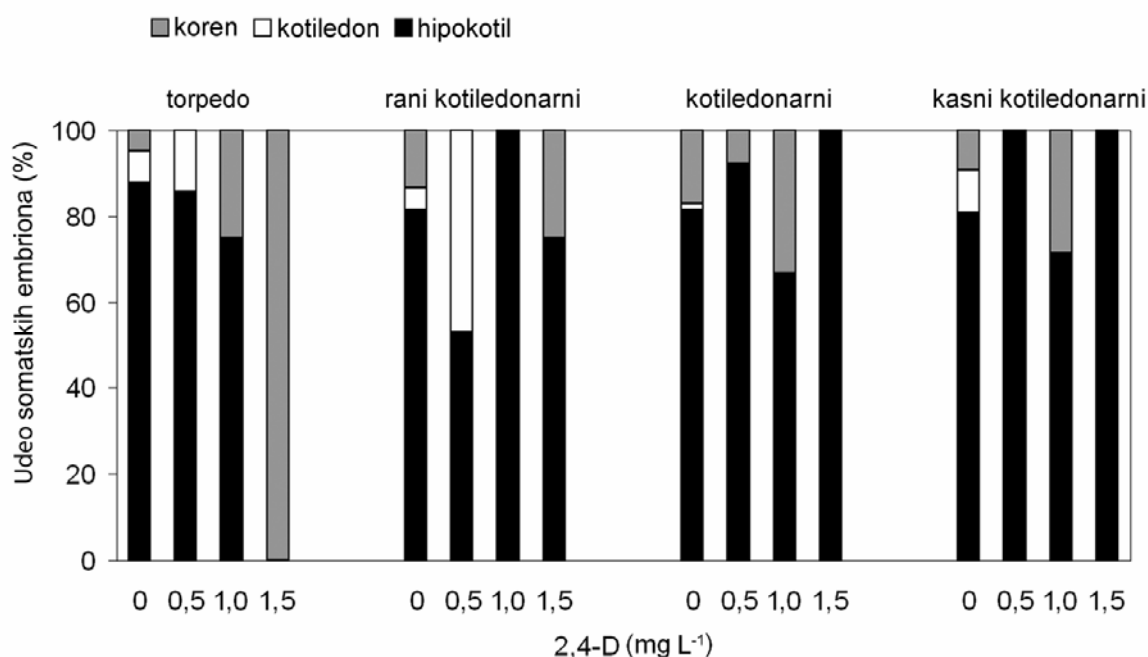
Indeks kapaciteta formiranja somatskih embriona, koji odražava kumulativni efekat frekvencije i intenziteta somatske embriogeneze, pokazao je da je embriogeni odgovor nezrelih embriona gajenih na osnovnoj hranljivoj podlozi zavisio i od dužine perioda gajenja i od stadijuma razvića početnih eksplantata (**Grafik 1**).



**Grafik 1.** Efekat vremena gajenja i stadijuma razvića početih eksplantata na embriogeni odgovor nezrelih zigotskih embriona kelerabe, sorta Bečka Plava, gajenih na osnovnoj hranljivoj podlozi. Za svaku vremensku tačku, izračunata je srednja vrednost  $\pm$  S.E. za tri nezavisna ponavljanja.

U svakoj tački vremena, vrednosti indeksa su se statistički značajno razlikovale za sve testirane početne eksplantate u različitim stadijumima razvića. Na osnovu vrednosti datog indeksa, zigotski embrioni u ranom kotiledonarnom stadijumu su se pokazali kao najefikasniji eksplantati za indukciju somatske embriogeneze.

Većina primarnih somatskih embriona formirana je u zoni hipokotila, bez obzira na početni stadijum razvića zigotskih embriona koji su korišćeni kao eksplantati, ili upotrebljene hranljive podloge (**Grafik 2**). Formiranje somatskih embriona bilo je manje izraženo na kotiledonima i korenu, osim kod eksplantata u torpedo stadijumu gajenih na  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D gde su svi somatski embrioni bili formirani u zoni korena. Somatski embrioni regenerisani iz hipokotila su se brže razvijali od onih regenerisanih iz kotiledona ili korena.



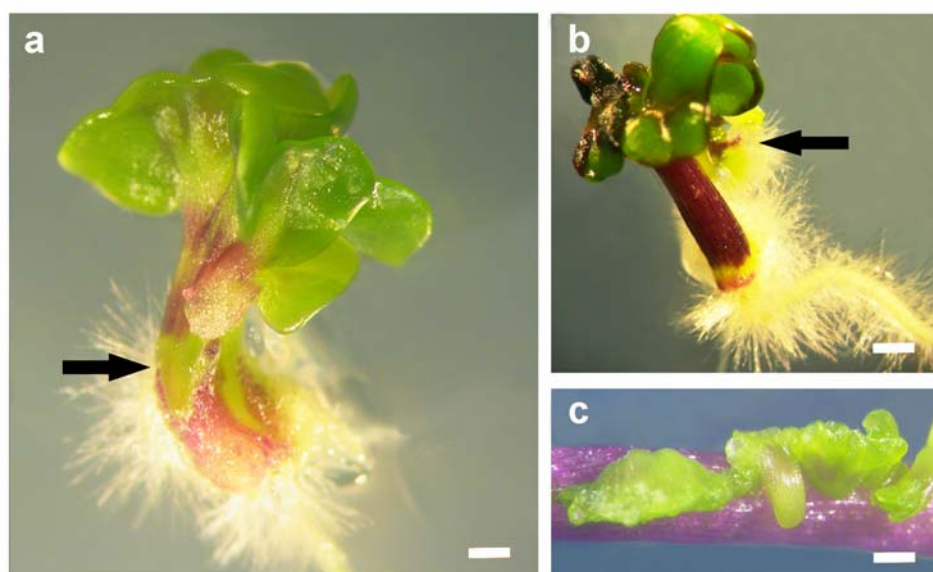
**Grafik 2.** Udeo somatskih embriona formiranih na različitim delovima iskljalih početnih eksplantata, sorta Bečka Plava, gajenim na različitim koncentracijama 2,4-D.

Procenat klijanja primarnih embriona na osnovnoj hranljivoj podlozi bio je 100%. Iskljalni embrioni su imali dobro razvijen koren i kotiledone (**Slika 8e**). Kod veoma malog broja somatskih embriona došlo je do pojave fascijacije, odnosno srastanja većeg broja embriona; ovi somatski embrioni su formirali deformisane biljčice.

#### 4.1.2. Sekundarna somatska embriogeneza

Sekundarni embrioni su se spontano formirali na primarnim somatskim embrionima kelerabe nakon pet nedelja gajenja inicijalnih zigotskih eksplantata na osnovnoj hranljivoj podlozi (**Slika 9a i b**). Najbolji odgovor dobijen je kod eksplantata u ranom kotiledonarnom stadijumu, dok je kod onih u stadijumu torpeda zabeležena najniža frekvencija sekundarne somatske embriogeneze (**Tabela 12**). Kod sekundarne somatske embriogeneze, pojava fascijacije (**Slika 9c**) dostigla je frekvenciju od 7%, što je značajno više u odnosu na primarnu somatsku embriogenezu. Pojedinačni sekundarni embrioni su izolovani sa primarnih i preneti na svežu hranljivu podlogu bez regulatora rastenja, gde je 100% embriona iskljalalo a 96% se razvilo u biljčice. Na razvijenim

biljčicama su se formirali novi somatski embrioni. Kultura sekundarnih somatskih embriona se kontinuirano održavala subkultivacijom svake četiri nedelje.



**Slika 9.** Spontana pojava sekundarne somatske embriogeneze na primarnim somatskim embrionima kelerabe, sorta Bečka Plava, gajenim na osnovnoj hranljivoj podlozi. (a) Sekundarni embrion u kotiledonarnom stadijumu (*strelica*) formiran na hipokotilu iskljalog primarnog embriona 5 nedelja nakon postavljanja nezrelih zigotskih embriona na podlogu, *bar* = 3 mm; (b) Veći broj sekundarnih somatskih embriona (*strelica*) formiranih na biljčici razvijenoj iz primarnog embriona, *bar* = 4 mm; (c) Pojava fascijacije sekundarnih somatskih embriona, *bar* = 3 mm.

**Tabela 12.** Spontana sekundarna embriogeneza na primarnim somatskim embrionima kelerabe, sorta Bečka Plava, nakon pet nedelja gajenja nezrelih zigotskih eksplantata na osnovnoj hranljivoj podlozi

Stadijum razvića nezrelog zigotskog embriona	Frekvencija embriogeneze (%) ± S.E.*	Intenzitet embriogeneze ± S.E.**	EFC***
Torpedo	41,28 ± 1,06 c	1,42 ± 0,29 c	0,59
Rani kotiledonarni	73,85 ± 0,53 a	8,17 ± 1,32 a	6,03
Kotiledonarni	67,09 ± 0,51 b	6,81 ± 0,67 ab	4,57
Kasni kotiledonarni	60,63 ± 0,48 b	6,16 ± 0,94 b	3,73

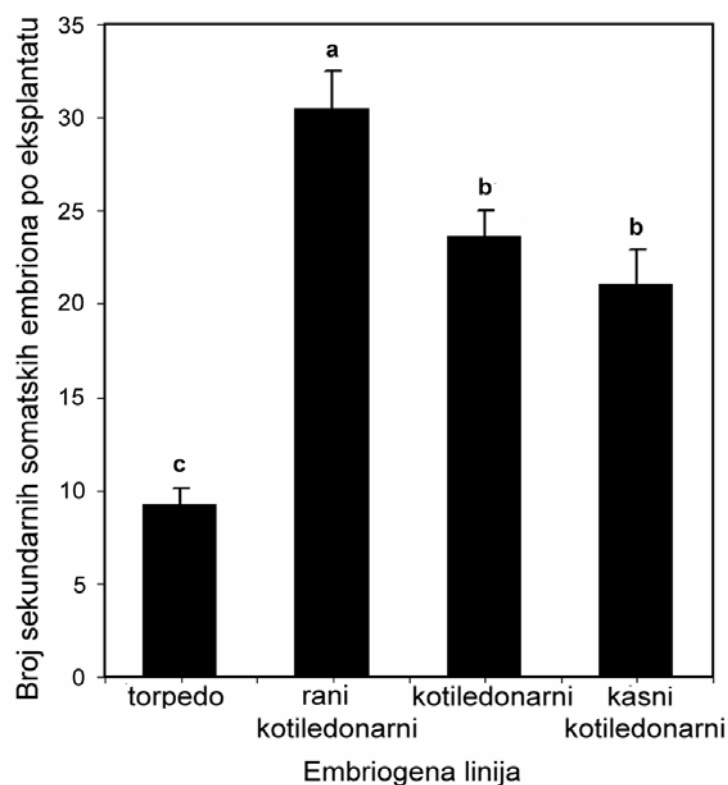
Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

\* Frekvencija embriogeneze: procenat eksplantata koji su formirali najmanje jedan somatski embrion.

\*\* Intenzitet embriogeneze: srednja vrednost broja sekundarnih somatskih embriona formiranih po primarnom somatskom embrionu.

\*\*\* EFC: Indeks kapaciteta formiranja somatskih embriona, izračunat kao [(frekvencija embriogeneze) × (intenzitet embriogeneze) / 100].

Nakon 12 subkultivacija, potencijal za sekundarnu embriogenezu kod embriogenih linija poreklom od sva 4 tipa zigotskih eksplantata ostao je visok. Najviši intenzitet sekundarne somatske embriogeneze za period od 5 nedelja je zabeležen kod embriogenih linija koje su vodile poreklo od početnih eksplantata u ranom kotiledonarnom stadijumu i iznosio je 30,4 (**Grafik 3**).



**Grafik 3.** Embriogeni potencijal jednogodišnjih embriogenih linija kelerabe, poreklom sa različitih zigotskih eksplantata, gajenih na osnovnoj hranljivoj podlozi. Embriogeni potencijal je izražen kao prosečan broj novoformiranih embriona nakon 5 nedelja gajenja pojedinačnih embriona, uzetih iz kultura starih godinu dana, na osnovnoj hranljivoj podlozi. Rezultati predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ); različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku između srednjih vrednosti prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.3. Efekat citokinina na formiranje sekundarnih embriona

U cilju testiranja efekta različitih citokinina na formiranje sekundarnih embriona, kao eksplantati su korišćeni primarni somatski embrioni u globularnom i kotiledonarnom stadijumu, poreklom od RK zigotskih embriona. Oni su prenešeni na

podloge u koje je dodato po 1 mg L<sup>-1</sup> jednog od četiri različita citokinina. Sekundarni somatski embrioni su detektovani nakon nedelju dana, a formirali su se putem direktne somatske embriogeneze bez formiranja kalusa. Bez obzira na upotrebljeni citokinin, sekundarni somatski embrioni su se uglavnom formirali na hipokotilima, slično kao kod primarne somatske embriogeneze.

Nakon pet nedelja gajenja somatskih embriona na podlozi sa citokininima, na frekvenciju sekundarne embriogeneze značajno je uticao kako stadijum razvića eksplantata tako i upotrebljeni citokinin, pri čemu nije bilo interakcije između navedenih faktora (**Tabela 13**). Frekvencija embriogeneze je varirala od 80,7% (TDZ i BAP) do 100% (osnovna hranljiva podloga) kada su kao eksplantati korišćeni primarni somatski embrioni u kotiledonarnom stadijumu. Eksplantati u globularnom stadijumu su imali manje izražen embriogeni odgovor, pri čemu su najveće vrednosti frekvencije dobijene na hranljivoj podlozi obogaćenju sa *cisZ* (90,7%) i osnovnoj hranljivoj podlozi (73,8%).

**Tabela 13.** Efekat različitih citokinina na indukciju sekundarne somatske embriogeneze kod primarnih embriona kelerabe, sorta Bečka Plava, nakon 5 nedelja gajenja

Stadijum razvića primarnog somatskog embriona	Egzogeni citokinin (mg L <sup>-1</sup> )	Frekvencija embriogeneze (%) ± S.E.*	Intenzitet embriogeneze ± S.E.**	EFC***
Globularni	0	73,79 ± 0,47 cd	10,89 ± 2,88 ab	8,04
	<i>cisZ</i> 1	90,72 ± 2,43 bc	4,96 ± 1,25 b	4,49
	<i>transZ</i> 1	60,58 ± 1,46 d	8,94 ± 3,47 ab	5,41
	TDZ 1	67,13 ± 0,52 cd	8,65 ± 2,71 ab	5,81
	BAP 1	67,13 ± 0,52 cd	4,97 ± 1,35 b	3,34
	Kotiledonarni	0	100,00 ± 0,00 a	13,48 ± 1,89 a
<i>cisZ</i> 1		98,04 ± 1,89 ab	12,52 ± 2,71 a	12,27
<i>transZ</i> 1		89,75 ± 3,15 bc	9,27 ± 1,48 ab	8,32
TDZ 1		80,71 ± 0,14 cd	10,44 ± 1,63 ab	8,43
BAP 1		80,71 ± 0,14 cd	8,66 ± 2,06 ab	6,99

Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti p ≤ 0,05.

\* Frekvencija embriogeneze: procenat eksplantata koji su formirali najmanje jedan somatski embrion.

\*\* Intenzitet embriogeneze: srednja vrednost broja sekundarnih somatskih embriona formiranih po primarnom somatskom embrionu.

\*\*\* EFC: Indeks kapaciteta formiranja somatskih embriona, izračunat kao [(frekvencija embriogeneze) × (intenzitet embriogeneze) / 100].

Stadijum razvića primarnih somatskih embriona značajno je uticao na prosečan broj sekundarnih embriona, ali tip primenjenog citokinina, primenjenog u datoj koncentraciji, nije (**Tabela 13**). Takođe, interakcije između ova dva faktora nisu postojale.

#### 4.1.4. Histološka analiza

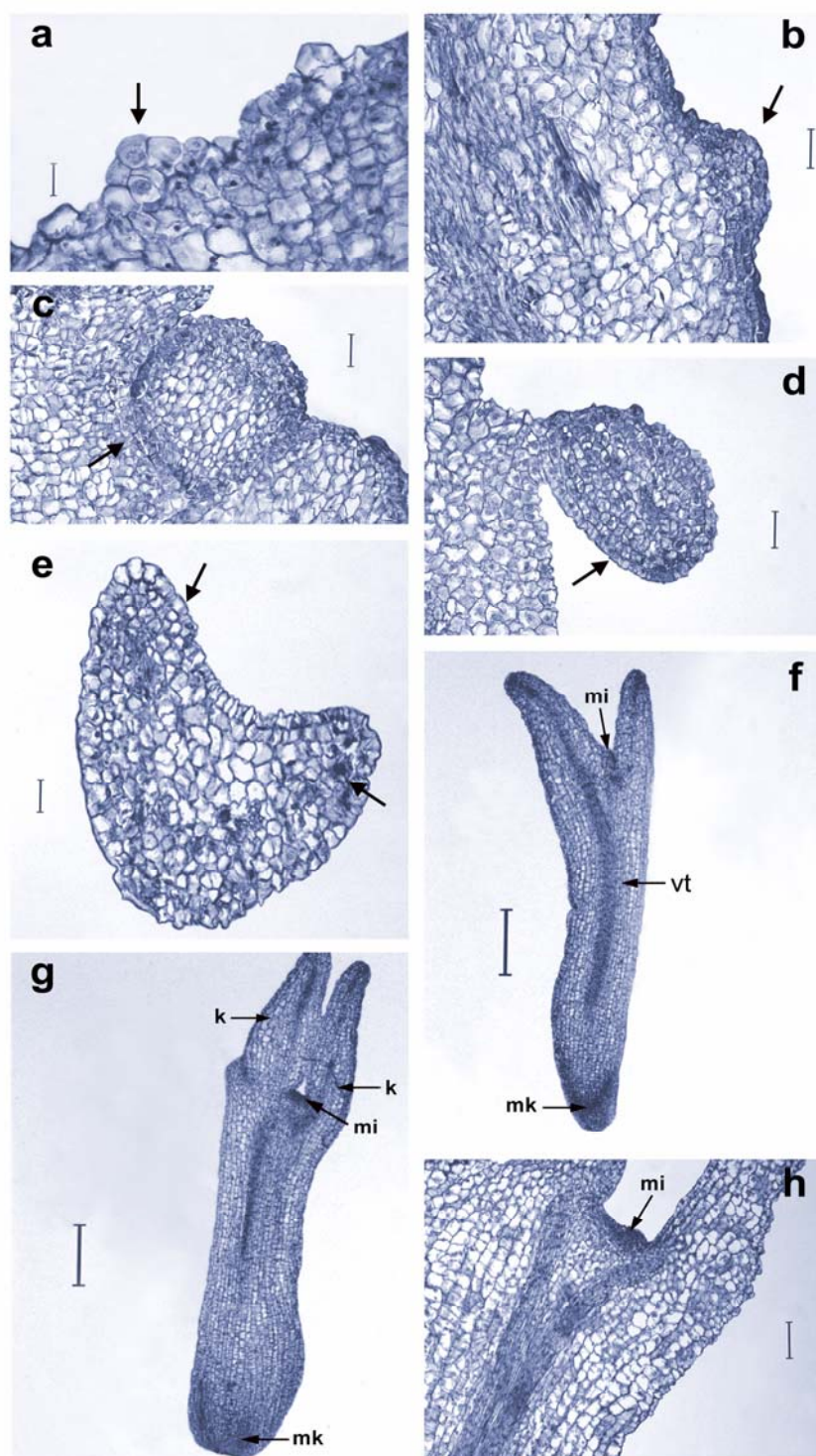
Histološka analiza je rađena kod sekundarnih somatskih embriona u kotiledonarnom stadijumu razvića, tri dana nakon njihovog prenošenja na svežu osnovnu hranljivu podlogu. Histološkom analizom su uočene ćelijske deobe u spoljašnjem ćelijskom sloju hipokotiledonarnog regiona. Kontinualne deobe u ovom području su dovele do formiranja malih globularnih promeristemskih struktura, najverovatnije jednoćelijskog porekla (**Slika 10a**).

U novoformiranim kompaktnim masama mogle su se jasno uočiti ćelije u intenzivnoj deobi sa gustom citoplazmom i upadljivim jedrima (**Slika 10b**). Daljim umnožavanjem ćelija došlo je do formiranja globularnih embriona koji su bili jasno definisani u odnosu na okolno tkivo (**Slika 10c**). Takođe, globularni embrioni su se odlikovali jasno diferenciranim protodermisom i uzanim bazalnim spojem sa materinskim tkivom (**Slika 10d**).

Dalje razviće globularnih embriona dovelo je do formiranja embriona u stadijumu srca kod kojih su se mogli uočiti protodermis i zona ćelija u deobi ispod protodermisa (**Slika 10e**).

Embrioni u stadijumu torpeda (**Slika 10f**) su ispoljavali bipolarnu organizaciju, sa korenovim vrhom na bazalnom polu i vrhom izdanka na apikalnom polu, a takođe se moglo uočiti i karakteristično provaskularno tkivo. Embrioni na kotiledonarnom stadijumu (**Slika 10g**) su imali po dve kotiledonu slične strukture, slično onim kod zigotskih embriona biljke, kao i dobro razvijen meristem izdanka na apikalnom polu (**Slika 10h**).





**Slika 10.** Histološka analiza sekundarne somatske embriogeneze kod kelerabe, sorta Bečka Plava, indukovane na osnovnoj hranljivoj podlozi. (a) Promeristemska struktura (*strelica*) formirana u protodermisu hipokotila eksplantata, *bar* = 16  $\mu\text{m}$ ; (b) Inicijalna faza formiranja proembriona (*strelica*) sa gustom obojenim meristemskim ćelijama što ukazuje na intenzivne ćelijske deobe, *bar* = 25  $\mu\text{m}$ ; (c) Globularni embrion (*strelica*) jasno izdvojen u odnosu na okolno tkivo, *bar* = 40  $\mu\text{m}$ ; (d) Odvajanje globularnog embriona kod kojeg je diferenciran protodermis (*strelica*), *bar* = 50  $\mu\text{m}$ ; (e) Srcasti

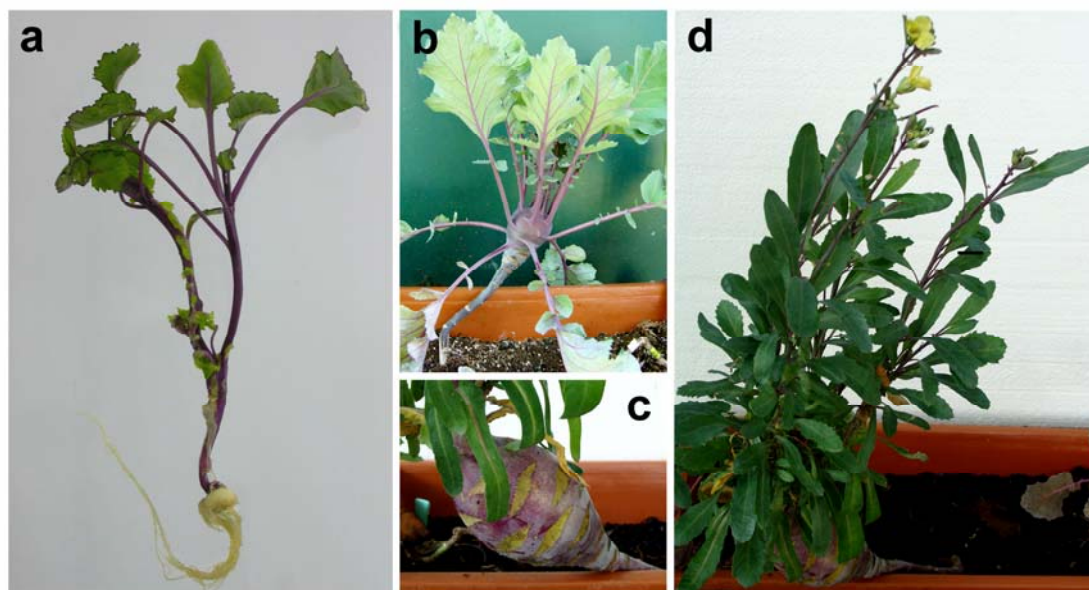
embrion sa protodermisom (*gornja strelica*) i zonom ćelija koje se dele (*donja strelica*), *bar* = 50  $\mu\text{m}$ ; (f) Stadijum kasnog torpeda sa definisanim apikalnim meristemom izdanka (*mi*), meristemom korena (*mk*), i provaskularnim tkivom (*vt*), *bar* = 200  $\mu\text{m}$ ; (g) Kotiledonarni somatski embrion (*k*, kotiledon; *mi*, apikalni meristem izdanka; *mk*, meristem korena), *bar* = 200  $\mu\text{m}$ ; (h) Uzdužni presek embriona u kotiledonarnom stadijumu razvića sa dobro razvijenim apikalnim meristemom izdanka (*mi*), *bar* = 80  $\mu\text{m}$ .

Meristemske ćelije su se mogle prepoznati po tamno obojenoj citoplazmi i velikim jedrima, suprotno od svetle citoplazme ispunjene vakuolama kod većine embrionalnih ćelija. U grupacijama somatskih embriona mogli su se uočiti različiti razvojni stadijumi, ukazujući na nesinhronizovano razviće. Embrioni u kasnijim stadijumima razvića (rani kotiledonarni i kotiledonarni) su se mogli lako osloboditi od okolnog tkiva. Nije postojala vaskularna veza između materinskog tkiva i embriona koji se razvijaju. Formiranje embriona se najverovatnije odvijalo putem direktne embriogeneze, s obzirom na to da kalus nije bio uočen.

#### 4.1.5. Aklimatizacija i analiza ploidnosti regenerisanih biljaka

Nakon što su sekundarni embrioni vertikalno postavljeni na osnovnu hranljivu podlogu u tegle od 250 ml, 96% embriona se spontano razvilo u mlade biljčice. Većina biljaka razvijenih iz somatskih embriona se nije razlikovala od kontrolnih biljaka. Dobro razvijene biljke (**Slika 11a**) su posađene u zemlju i nakon mesec dana aklimatizacije stepen preživljavanja iznosio je 72,5%. Biljke su imale normalnu morfologiju i razvile su zadebljanje na stablu u roku od 4 meseca (**Slika 11b i c**). Nakon 10 meseci gajenja u staklenoj bašti biljke su procvetale a zatim i formirale mahune (**Slika 11d**).

Protočna citometrija sprovedena na aklimatizovanim biljkama pokazala je da je 96,7% analiziranih regenerisanih biljaka bilo diploidno, što je ukazalo na to da kod većine regenerisanih biljaka kelerabe nije došlo do remećenja ploidnosti.

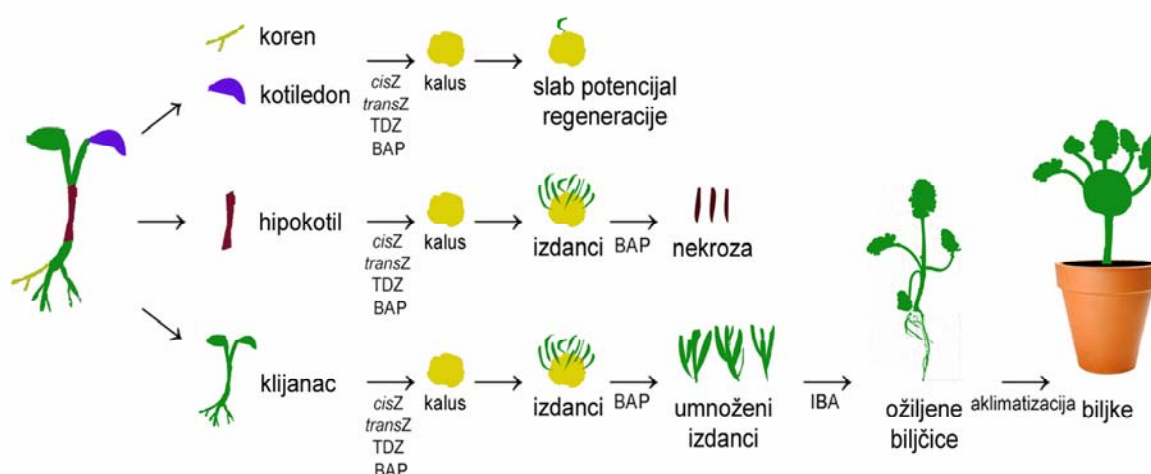


**Slika 11.** Aklimatizacija biljaka kelerabe, sorta Bečka Plava, regenerisanih putem somatske embriogeneze. (a) Biljčica razvijena iz sekundarnog somatskog embriona; (b) Aklimatizovana biljka normalne morfologije; (c) Zadebljanje formirano debljanjem tkiva donjeg regiona stabla; (d) Biljka kelerabe u cvetu i stvaranje mahuna nakon 10 meseci gajenja u staklenoj bašti.

#### 4.2. Regeneracija biljaka kelerabe putem organogeneze

Regeneracija biljaka kelerabe, sorte Bečka Plava i Bečka Bela, odvijala se putem indirektno *de novo* organogeneze izdanaka kod kojih je zatim indukovano formiranje adventivnih korenova.

*De novo* regeneracija izdanaka na hranljivim podlogama sa pojedinačnim citokininima (cisZ, transZ, BAP i TDZ) je praćena kod različitih tipova eksplantata (**Slika 12**).



**Slika 12.** Shematski prikaz regeneracije biljaka kod dve sorte kelerabe, Bečka Plava i Bečka Bela putem organogeneze iz različitog početnog biljnog materijala. Uspješna regeneracija izdanaka *de novo* postignuta je iz odsečaka hipokotila i intaktnih klijanaca, ali su se ožiljene kao i aklimatizovane biljke dobijene samo iz izdanaka regenerisanih iz intaktnih klijanaca.

#### 4.2.1. Regeneracija iz odsečaka korena i kotiledona

Kod odsečaka korenova gajenih u prisustvu egzogeno dodatih citokinina došlo je najpre do njihovog izduživanja i grananja, a zatim i do formiranja rastresitog žućkastog kalusa na mestima grananja. Pupoljci su se pojavili samo na podlozi sa  $2 \text{ mg L}^{-1}$  *cisZ* (0,56%) kod BP (**Slika 13**), odnosno sa  $2 \text{ mg L}^{-1}$  *transZ* (0,28%) kod BB.



**Slika 13.** Indirektna organogeneza iz odsečaka korena kelerabe, sorta Bečka Plava, nakon 6 nedelja gajenja na podlozi sa  $2 \text{ mg L}^{-1}$  *cisZ*.

Odsecci kotiledona su tokom gajenja na podlogama obogaćenim citokininima zadebljali i porasli, a indirektna organogeneza je bila inicirana samo na ivicama kotiledona. Slično kao kod korenova, regenerativni odgovor je bio slab tako da je nakon 6 nedelja gajenja regeneracija dobijena jedino kod sorte BP na hranljivoj podlozi sa 2 mg L<sup>-1</sup> TDZ (1%). Eksplantati na ostalim citokininskim tretmanima, kao i eksplantati gajeni na kontrolnoj podlozi su vremenom nekrozirali.

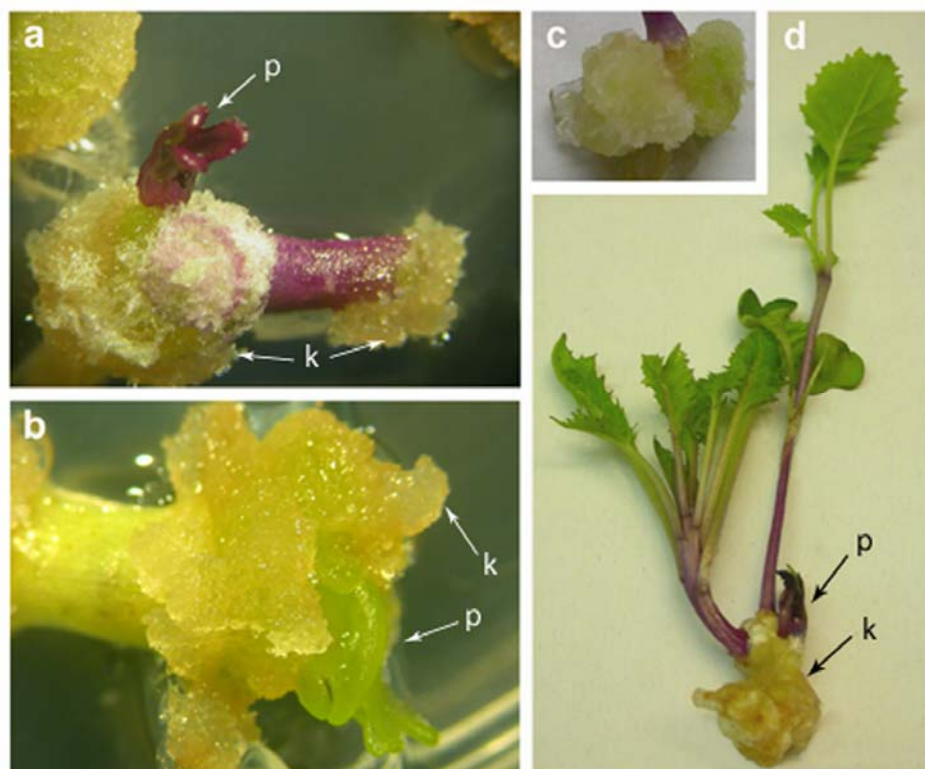
Usled slabog regenerativnog odgovora, ova dva tipa eksplantata isključena su iz daljih istraživanja.

#### 4.2.2. Regeneracija iz odsečaka hipokotila i intaktnih klijanaca

Nakon 6 nedelja gajenja na hranljivim podlogama sa citokininima odsecci hipokotila obe sorte bili su okarakterisani debljanjem i pojavom rastresitog svetlo zeleno-žutog kalusa. Procenat kalusa na kojima je došlo do pojave pupoljaka se kretao do 4% kod BP (**Slika 14a, Tabela 14**) i do 7% kod BB (**Slika 14b, Tabela 15**). Kalusi su se formirali kako na ivicama tako i duž odsečaka hipokotila.

Organogeni odgovor u kontrolnim odseccima hipokotila gajenim na podlozi bez regulatora rastenja izostao je i nakon 6 nedelja kada je došlo do pojave nekroze i propadanja eksplantata.

Intaktni klijanci koji su korišćeni kao početni materijal za regeneraciju biljaka kelerabe putem organogeneze su dobijeni isključivanjem semena na podlogama sa različitim citokininima. Klijavost semena je bila 100%. Razvijeni klijanci su dalje tretirani kao eksplantati za regeneraciju *de novo* izdanaka. Nakon dve nedelje došlo je do formiranja kalusa u osnovi stabla klijanaca (**Slika 14c**), i to kod 100% klijanaca na podlogama sa TDZ, odnosno BAP, i do 96% na podlogama sa zeatinom. Nedelju dana nakon formiranja kalusa na njima je uočena regeneracija pupoljaka (**Slika 14d**). Frekvencija regeneracije dostigla je vrednosti od 50% kod BP (**Tabela 14**) i 60% kod BB (**Tabela 15**) nakon 6 nedelja gajenja.



**Slika 14.** Indirektna organogeneza iz odsečaka hipokotila i intaktnih klijanaca kelerabe gajenih na hranljivoj podlozi za indukciju regeneracije. (a) Formiranje pupoljka na odsečku hipokotila, sorta Bečka Plava (BP), gajenog 6 nedelja na podlozi sa 2 mg L<sup>-1</sup> *cisZ*; (b) Eksplantat hipokotila sorte Bečka Bela, gajen 6 nedelja na hranljivoj podlozi obogaćenoj sa 2 mg L<sup>-1</sup> *transZ*, sa formiranim kalusom i regenerisanim pupoljcima; (c) Formiranje kalusa u osnovi hipokotila BP klijanca, nakon dve nedelje gajenja na podlozi sa 5 mg L<sup>-1</sup> BAP; (d) Regeneracija izdanaka kod BP klijanca nakon 6 nedelja gajenja na podlozi sa 5 mg L<sup>-1</sup> BAP; *k* – kalus, *p* – pupoljak.

Semena gajena na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja su se razvila u biljke na kojima nije došlo do formiranja kalusa ni nakon 6 nedelja. Takođe, ove biljke su imale dobro razvijen korenov sistem, za razliku od biljaka tretiranih TDZ i BAP kod kojih je izostalo formiranje korena ili je koren zakržljao.

*De novo* organogeneza izdanaka se nije odvijala u isto vreme na svim eksplantatima. Različiti stadijumi razvića izdanaka mogli su se uočiti među različitim eksplantatima, kao i na istom eksplantatu (Slika 14d). Uopšte, izdanci formirani *de novo* iz intaktnih klijanaca bili su vijabilni u poređenju sa onima regenerisanim iz odsečaka hipokotila koji su se slabo razvijali.

**Tabela 14.** Efikasnost regeneracije izdanaka kelerabe, sorta Bečka Plava, iz eksplantata hipokotila i klijanaca gajenih 6 nedelja na hranljivim podlogama sa različitim citokininima

Tip eksplantata	Egzogeni citokinin (mg L <sup>-1</sup> )	Frekvencija organogeneze (%) ± S.E.	Prosečan broj izdanaka po eksplantatu ± S.E.
Odsečak hipokotila	0	0,00 ± 0,00 f	0,00 ± 0,00 g
	<i>cisZ</i> 1	0,28 ± 0,28 ef	4,00 ± 0,65 def
	<i>cisZ</i> 2	4,08 ± 0,05 d	9,00 ± 0,49 c
	<i>transZ</i> 1	0,28 ± 0,28 ef	3,00 ± 0,25 defg
	<i>transZ</i> 2	3,29 ± 0,91 d	24,67 ± 3,03 a
	TDZ 2	0,28 ± 0,28 ef	15,00 ± 0,74 b
	BAP 5	0,28 ± 0,28 ef	10,00 ± 0,98 c
Klijanac	0	0,00 ± 0,00 f	0,00 ± 0,00 g
	<i>cisZ</i> 1	0,00 ± 0,00 f	0,00 ± 0,00 g
	<i>cisZ</i> 2	2,48 ± 0,01 de	2,00 ± 0,25 fg
	<i>transZ</i> 1	29,92 ± 0,10 c	2,67 ± 0,36 fg
	<i>transZ</i> 2	37,41 ± 0,16 bc	2,86 ± 0,32 efg
	TDZ 2	50,00 ± 0,16 ab	5,20 ± 0,71 de
	BAP 5	60,10 ± 0,22 a	5,42 ± 0,67 d

Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

Kod obe sorte kelerabe zabeležen je statistički značajan uticaj tipa eksplantata i podloge za regeneraciju na frekvenciju organogeneze kao i na prosečan broj izdanaka po eksplantatu (**Tabele 14 i 15**). Takođe je uočeno postojanje interakcije ova dva faktora. Frekvencija regeneracije iz intaktnih klijanaca bila je značajno viša u odnosu na odsečke hipokotila na svim testiranim citokininima, osim kod BP na podlogama sa *cisZ*.

Među svim primenjenim citokininima, najviše vrednosti za frekvenciju *de novo* organogeneze izdanaka kod klijanaca dobijene su na hranljivim podlogama sa BAP (60%) i TDZ (50%) kod BP (**Tabela 14**), dok su TDZ, BAP i *transZ* ispoljili sličan efekat na organogenezu izdanaka kod BB gde su dostignute vrednosti frekvencije od 37% do 50% (**Tabela 15**). Kod obe sorte kelerabe, procenat klijanaca sa regenerisanim izdancima na hranljivoj podlozi sa *cisZ* je bio oko 10 puta niži u odnosu na podloge sa ostalim citokininima.

**Tabela 15.** Efikasnost regeneracije izdanaka kelerabe, sorta Bečka Bela, iz eksplantata hipokotila i klijanaca gajenih 6 nedelja na hranljivim podlogama sa različitim citokininima

Tip eksplantata	Egzogeni citokinin (mg L <sup>-1</sup> )	Frekvencija organogeneze (%) ± S.E.	Prosečan broj izdanaka po eksplantatu ± S.E
Odsečak hipokotila	0	0,00 ± 0,00 d	0,00 ± 0,00 e
	<i>cisZ</i> 1	1,11 ± 0,28 cd	4,50 ± 0,45 de
	<i>cisZ</i> 2	3,94 ± 1,01 bc	6,57 ± 1,08 cd
	<i>transZ</i> 1	0,56 ± 0,56 cd	9,56 ± 1,78 bc
	<i>transZ</i> 2	7,37 ± 0,08 b	13,00 ± 1,21 b
	TDZ 2	6,61 ± 0,03 b	31,12 ± 5,08 a
	BAP 5	4,46 ± 1,19 bc	10,12 ± 2,24 bc
	Klijanac	0	0,00 ± 0,00 d
<i>cisZ</i> 1		2,47 ± 0,02 bc	1,00 ± 0,12 e
<i>cisZ</i> 2		4,95 ± 0,03 bc	2,50 ± 0,15 de
<i>transZ</i> 1		42,42 ± 0,25 a	3,06 ± 0,41 de
<i>transZ</i> 2		37,49 ± 0,01 a	2,80 ± 0,22 de
TDZ 2		47,49 ± 0,03 a	4,00 ± 0,49 de
BAP 5		50,00 ± 1,35 a	4,20 ± 0,52 de

Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

Suprotno od BP klijanaca, najviše vrednosti frekvencije regeneracije izdanaka kod odsečaka BP hipokotila (4%) su dobijene na podlogama sa *cisZ* i *transZ* (**Tabela 14**). Kod odsečaka BB hipokotila nije zabeležena značajna razlika između efekata četiri vrste primenjenih citokinina, a frekvencija organogeneze je dostigla vrednost od 4 do 7% (**Tabela 15**). Imajući u vidu da su primenjene 2 različite koncentracije *cisZ* i *transZ*, pokazano je da je tretman sa 2 mg L<sup>-1</sup> rezultovao boljim organogenim odgovorom kod oba genotipa kelerabe.

Prosečan broj regenerisanih izdanaka po eksplantatu kod klijanaca je varirao između 2,00 (2 mg L<sup>-1</sup> *cisZ*) i 5,42 (5 mg L<sup>-1</sup> BAP) kod BP, i između 1,00 (1 mg L<sup>-1</sup> *cisZ*) i 4,20 (5 mg L<sup>-1</sup> BAP) kod BB. Najviša vrednost za prosečan broj formiranih izdanaka kod odsečaka hipokotila iznosila je 24,67 na 2 mg L<sup>-1</sup> *transZ* kod BP (**Tabela 14**) i 31,12 na 2 mg L<sup>-1</sup> TDZ kod BB (**Tabela 15**).



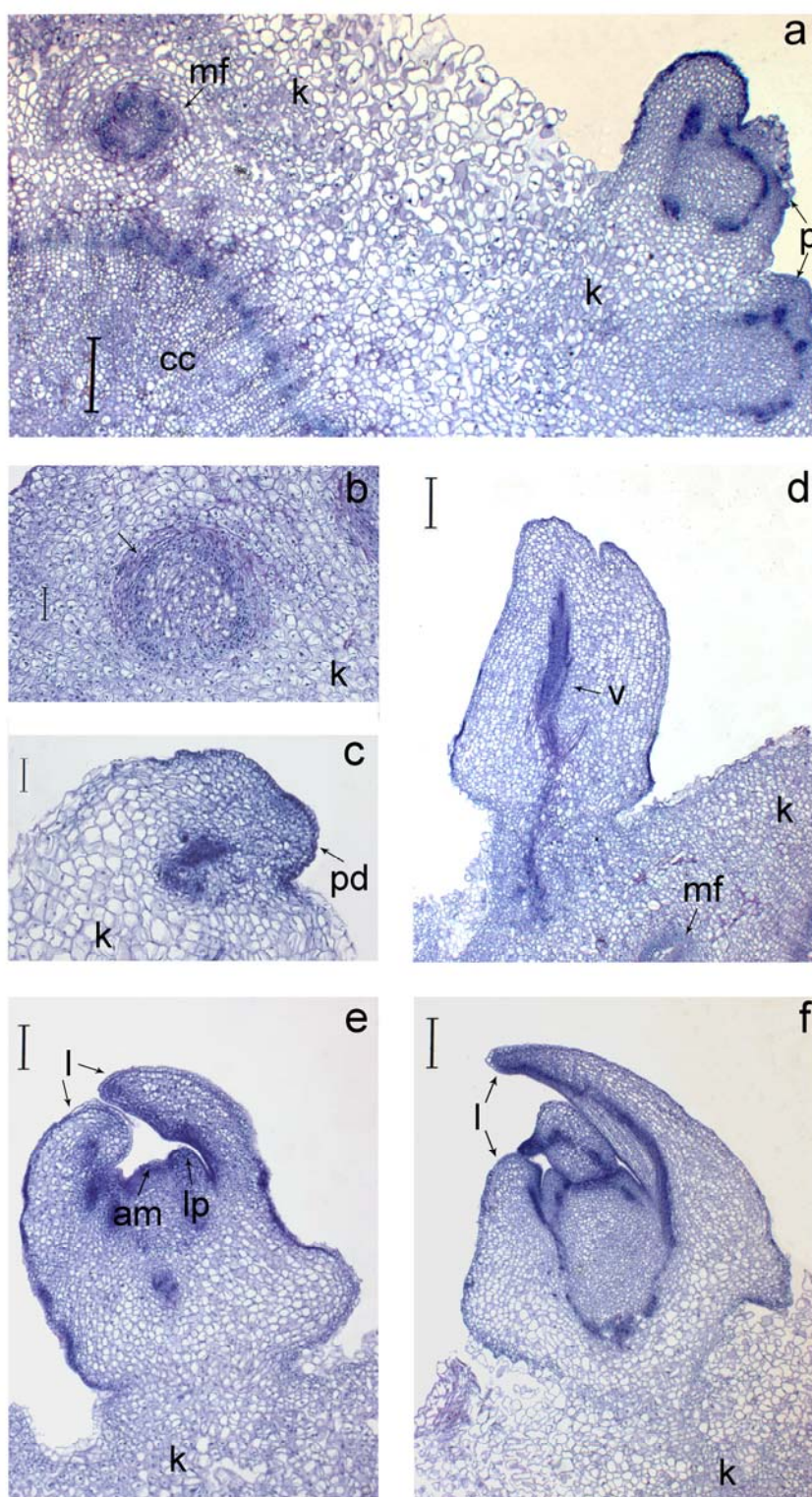
#### 4.2.3. Histološka analiza *de novo* formiranih pupoljaka kod klijanaca kelerabe tretiranih citokininima

Za histološku analizu uzimani su bazalni delovi stabla onih intaktnih klijanaca BP kelerabe gajenih 30 dana na hranljivim podlogama sa citokininima kod kojih je došlo do formiranja kalusa u bazalnim delovima stabla. Histološka analiza potvrdila je formiranje kalusa i pojavu *de novo* organogeneze kod intaktnih klijanaca gajenih na svim podlogama sa citokininima. Na preparatima se moglo jasno uočiti kalusno tkivo formirano oko centralnog cilindra eksplantata (**Slika 15a**). Zabeleženo je prisustvo *de novo* pupoljaka na različitim stadijumima razvića na kalusu istog eksplantata, što je ukazivalo na nesinhronizovanost procesa regeneracije (**Slika 15a**).

U kalusnoj strukturi mogle su se raspoznati tamno obojene meristemske formacije sa gusto pakovanim ćelijama (**Slika 15b**). Još u ranim fazama razvića primećeno je prisustvo jasno definisanog protodermalnog sloja na površini primordija pupoljka (**Slika 15c**). Sa napredovanjem razvića mogli su se uočiti elementi vaskularnog sistema kao tamnije obojene strukture u odnosu na okolno tkivo pupoljka (**Slika 15d**).

Kasnije faze razvića obuhvatale su formiranje strukture sa lisnim primordijama, a zatim i listovima oko apikalnog meristema izdanka (**Slika 15c, d i e**). Dobro razvijeni apikalni meristemi izdanka sastojali su se od brojnih malih ćelija koje su bile u fazi aktivnih ćelijskih deoba. U ovoj zoni uočena je kompaktna ćelijska organizacija, a jača obojenost ukazivala je na veliku metaboličku aktivnost (**Slika 15d**). Lisne primordije su imale definisani protodermalni sloj koji je pokrивao kompaktnu masu meristemskih ćelija od kojih će se kasnije formirati unutrašnja tkiva lista.

Data anatomski istraživanja pokazala su da se *de novo* formiranje pupoljaka kod kelerabe odvijalo putem procesa indirektno organogeneze, koja je uključivala pojavu kalusnog tkiva.



**Slika 15.** Histološka analiza pupoljaka formiranih putem indirektno *de novo* organogeneze kod intaktnih klijanaca kelerabe, sorta Bečka Plava, gajenih 30 dana na hranljivim podlogama sa citokininima. (a) Poprečni presek bazalnog dela stabla sa centralnim cilindrom (*cc*) i okolnim kalusnim tkivom (*k*) sa meristemskom formacijom

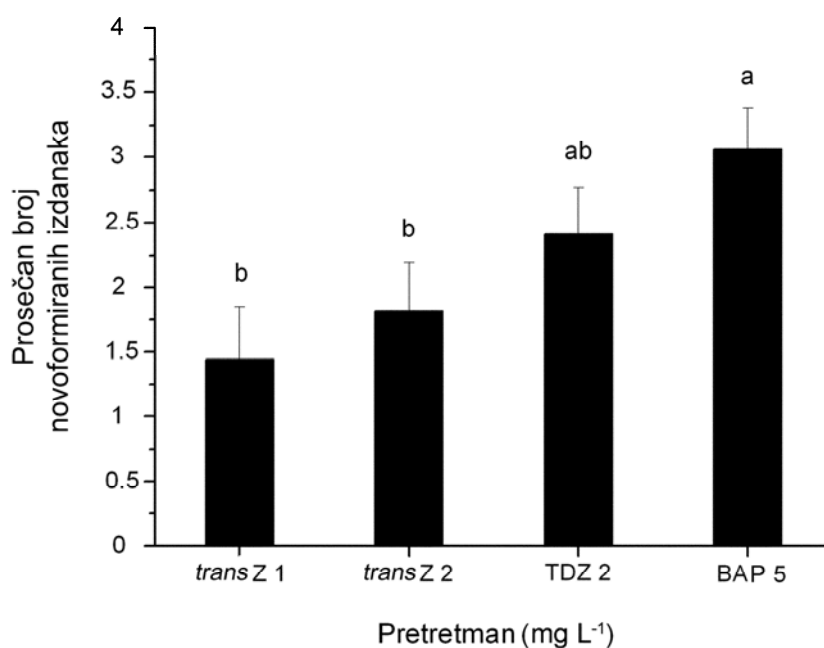
(*mf*) i pupoljcima (*p*) u ranoj fazi razvića, *bar* = 320 µm; (b) Meristemska formacija sa kompaktnom ćelijskom organizacijom (*strelica*) jasno uočljiva u odnosu na okolno kalusno tkivo, *bar* = 100 µm; (c) Početna faza razvića pupoljka sa jasno definisanim slojem protodermisa na površini (*pd*), *bar* = 80 µm (d) Ranija faza razvića pupoljka sa tamnije obojenim vaskularnim tkivom (*v*), *bar* = 320 µm; (e, f) Kasnije faze razvića pupoljaka kod kojih je dobro razvijen apikalni meristem (*am*) sa lisnim primordijama (*lp*), *bar* = 200 µm, odnosno mladim listovima (*l*), *bar* = 320 µm.

### 4.2.4. Efekat podloge za regeneraciju na stepen umnožavanja regenerisanih izdanaka

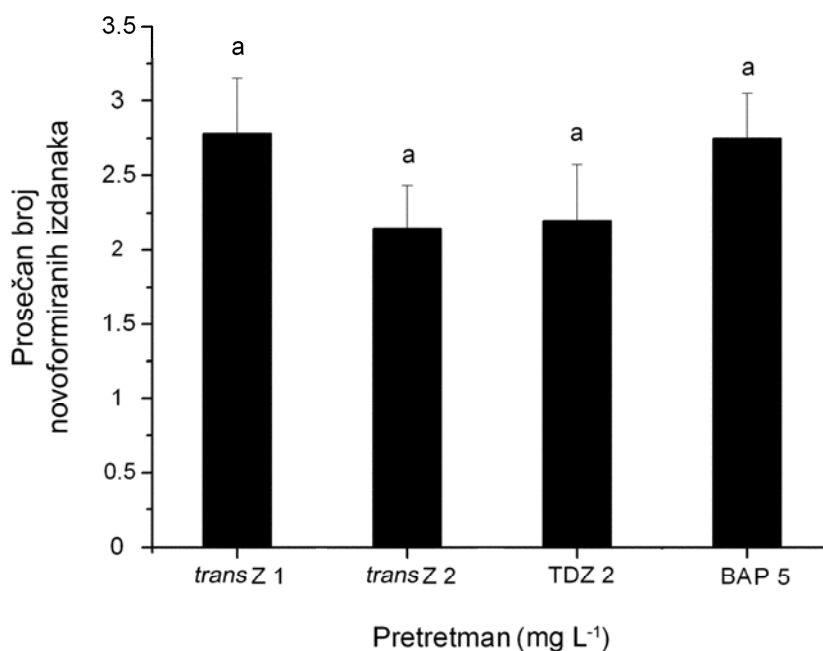
Izdanci regenerisani na podlogama sa različitim citokininima dodatim u različitim koncentracijama odvojeni su od kalusa a zatim postavljeni na podlogu sa 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP radi daljeg umnožavanja. Izdanci koji su regenerisani iz odsečaka hipokotila obe sorte se nisu umnožavali na ovoj hranljivoj podlozi i nakon nedelju dana gajenja došlo je do pojave nekroze.

Izdanci regenerisani iz intaktnih klijanaca obe sorte generalno su bili vijablini, izuzev onih dobijenih na podlozi sa *cisZ*, koji su bili veoma mali i sa pojavom nekroze, i kao takvi su izostavljeni iz daljih eksperimenata. Nakon četiri nedelje gajenja izdanaka na podlozi sa 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP, zabeležena je statistički značajna razlika u vrednostima za indeks multiplikacije, tj. u prosečnom broju novoformiranih izdanaka, između različitih citokininskih pretretmana kod BP kelerabe (**Grafik 4**). Izdanci regenerisani na podlogama sa *transZ* su ispoljili značajno manji stepen umnožavanja u odnosu na one dobijene na podlozi obogaćenoj sa BAP.

Suprotno BP, kod BB kelerabe nisu uočene značajne razlike u prosečnom broju novih izdanaka između različitih citokininskih pretretmana (**Grafik 5**).



**Grafik 4.** Prosečan broj novoformiranih izdanaka (indeks multiplikacije) kelerabe, sorta Bečka Plava, nakon 4 nedelja gajenja na podlozi sa 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti ± S.E. iz tri nezavisna eksperimenta sa po najmanje 25 regenerisanih izdanaka. Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .



**Grafik 5.** Prosečan broj novoformiranih izdanaka (indeks multiplikacije) kelerabe, sorta Bečka Bela, nakon 4 nedelja gajenja na podlozi sa 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP. Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti ± S.E. iz tri nezavisna eksperimenta sa po najmanje 25

regenerisanih izdanaka. Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

#### 4.2.5. Ožiljavanje regenerisanih izdanaka

Sposobnost ožiljavanja proučavana je kod izdanaka regenerisanih iz intaktnih klijanaca. Organogeneza adventivnih korenova kod ovih izdanaka zavisila je od primenjene koncentracije IBA u hranljivim podlogama. Nakon 5 nedelja gajenja, celokupna efikasnost ožiljavanja bila je viša kada su izdanci bili gajeni na podlozi sa  $4 \text{ mg L}^{-1}$  IBA nego sa  $2 \text{ mg L}^{-1}$  IBA i to kako kod BP (Slika 16a) tako i kod BB (Slika 16b). Na broj biljaka kod kojih je došlo do ožiljavanja statistički značajno su uticali citokininski pretretman i genotip, a postojala je i interakcija ova dva faktora. Najviši procenat ožiljenih izdanaka i kod BP (94,57%) i kod BB (90,19%) zabeležen je kod izdanaka regenerisanih na podlozi sa  $2 \text{ mg L}^{-1}$  *transZ* (Tabela 16).



**Slika 16.** Formiranje adventivnih korenova kod regenerisanih izdanaka dve sorte kelerabe: Bečka Plava (a) i Bečka Bela (b) nakon 5 nedelja gajenja na podlozi sa  $4 \text{ mg L}^{-1}$  IBA.

Dodatno su određene i fenotipske karakteristike biljaka ožiljenih na obe primenjene koncentracije IBA (**Tabela 16**). Kada je u pitanju visina biljaka, nije uočena statistički značajna razlika među različitim pretretmanima sa citokininima, osim kod izdanaka dobijenih na  $1 \text{ mg L}^{-1}$  *transZ* (**Tabela 16**).

Kod biljaka sorte Bečka Bela nije zabeležen statistički značajan uticaj ni podloge za ožiljavanje niti pretretmana na broj formiranih korenova. Suprotno tome, kod BP, povećanje primenjene koncentracije IBA u hranljivoj podlozi imalo je pozitivan efekat na broj formiranih korenova na *transZ* pretretmanima (**Tabela 16**). Najveća vrednost (8,69) zabeležena je kod biljaka regenerisanih na hranljivoj podlozi sa  $2 \text{ mg L}^{-1}$  *transZ*.

**Tabela 16.** Efikasnost ožiljavanja i fenotipske karakteristike biljaka kelerabe, sorte Bečka Plava (BP) i Bečka Bela (BB), nakon 5 nedelja gajenja na podlogama sa  $2 \text{ mg L}^{-1}$  IBA i sa  $4 \text{ mg L}^{-1}$  IBA

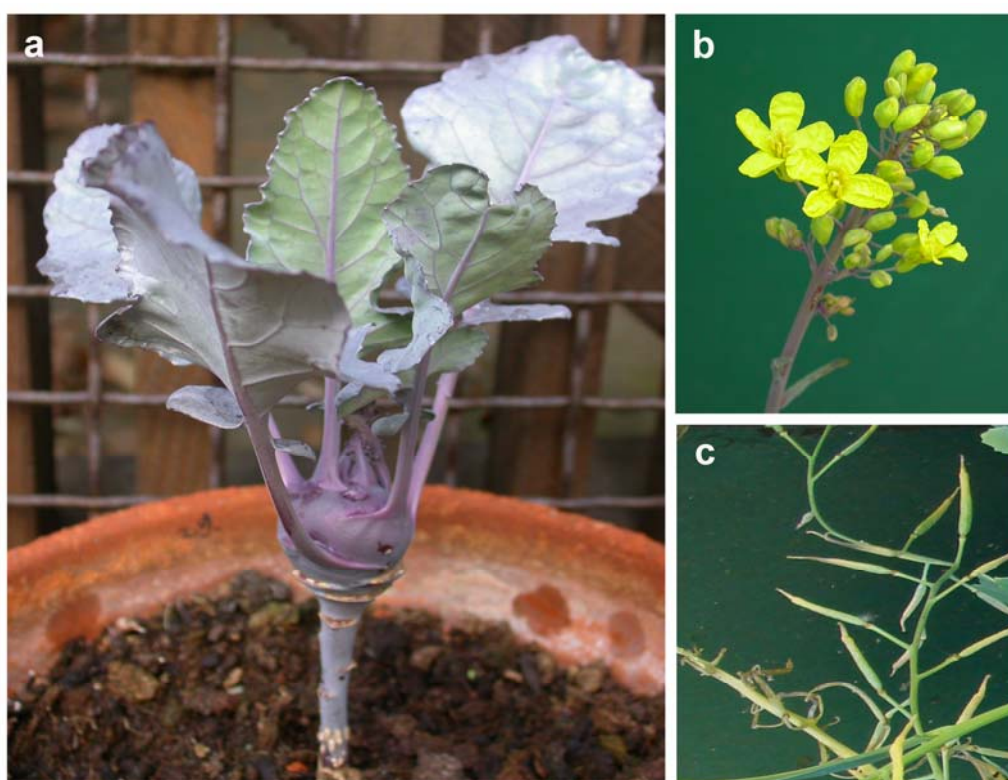
Koncentracija IBA ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Citokinin-ski pretretman ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Biljke sa korenovima (%) $\pm$ S.E.	Prosečan broj korenova $\pm$ S.E.	Prosečna dužina najdužeg korena (cm) $\pm$ S.E.	Prosečna visina biljaka (cm) $\pm$ S.E.
<b>BP</b>					
2	<i>transZ</i> 1	53,30 $\pm$ 0,03 d	3,75 $\pm$ 0,86 c	5,06 $\pm$ 0,87 bc	4,70 $\pm$ 0,53 d
	<i>transZ</i> 2	60,02 $\pm$ 0,04 cd	4,22 $\pm$ 0,51 c	5,67 $\pm$ 0,64 bc	6,05 $\pm$ 0,29 bc
	TDZ 2	66,71 $\pm$ 0,01 c	6,30 $\pm$ 1,06 abc	6,75 $\pm$ 0,83 bc	6,25 $\pm$ 0,33 bc
	BAP 5	43,29 $\pm$ 0,03 e	6,85 $\pm$ 0,90 abc	7,69 $\pm$ 0,99 ab	6,15 $\pm$ 0,40 bc
4	<i>transZ</i> 1	58,31 $\pm$ 0,03 d	6,87 $\pm$ 0,99 ab	4,71 $\pm$ 1,15 c	5,37 $\pm$ 0,67 cd
	<i>transZ</i> 2	94,57 $\pm$ 0,28 a	8,69 $\pm$ 1,32 a	6,34 $\pm$ 0,71 bc	6,82 $\pm$ 0,50 ab
	TDZ 2	80,04 $\pm$ 0,03 b	6,95 $\pm$ 0,75 a	7,15 $\pm$ 0,44 bc	6,75 $\pm$ 0,33 ab
	BAP 5	76,74 $\pm$ 0,03 b	8,26 $\pm$ 0,80 a	9,30 $\pm$ 0,85 a	7,28 $\pm$ 0,36 a
<b>BB</b>					
2	<i>transZ</i> 1	50,00 $\pm$ 0,05 d	4,13 $\pm$ 0,66 b	6,10 $\pm$ 0,58 a	7,33 $\pm$ 0,41 a
	<i>transZ</i> 2	39,99 $\pm$ 0,02 e	6,80 $\pm$ 1,32 a	5,80 $\pm$ 0,68 a	6,04 $\pm$ 0,28 b
	TDZ 2	19,94 $\pm$ 0,05 f	3,33 $\pm$ 0,67 b	5,00 $\pm$ 1,00 a	6,23 $\pm$ 0,39 ab
	BAP 5	66,82 $\pm$ 0,03 c	6,90 $\pm$ 0,71 a	6,10 $\pm$ 0,58 a	6,40 $\pm$ 0,35 ab
4	<i>transZ</i> 1	86,77 $\pm$ 0,05 a	5,65 $\pm$ 0,51 ab	7,32 $\pm$ 0,62 a	6,37 $\pm$ 0,44 ab
	<i>transZ</i> 2	90,19 $\pm$ 0,12 a	5,74 $\pm$ 0,61 ab	6,20 $\pm$ 0,45 a	6,53 $\pm$ 0,29 ab
	TDZ 2	70,01 $\pm$ 0,02 c	5,76 $\pm$ 0,73 ab	6,55 $\pm$ 0,60 a	6,92 $\pm$ 0,39 ab
	BAP 5	80,06 $\pm$ 0,05 b	5,87 $\pm$ 0,49 ab	6,67 $\pm$ 0,56 a	6,75 $\pm$ 0,35 ab

Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

Kod BP biljaka na 4 mg/L IBA samo je pretretman koji je sadržao BAP značajno uticao na dužinu korenova gde je vrednost iznosila 9,30 cm (Tabela 16). Kod BB biljaka pretretman citokininima nije uticao na ožiljavanje, a efekti različitih koncentracija IBA nisu se statistički razlikovali (Tabela 16).

#### 4.2.6. Analiza aklimatizovanih biljaka protočnom citometrijom

Biljke sa dobro razvijenim korenom su dalje zasađene u saksije sa supstratom i nakon mesec dana gajenja pod odgovarajućim uslovima staklene bašte aklimatizovano je 76,7% BP i 63,3% BB biljaka. Sve biljke koje su preživele aklimatizaciju su pokazivale normalnu morfologiju i razvile su zadebljanje na stablu u roku od četiri meseca (Slika 17a). Biljke su procvetale (Slika 17b) nakon 10 meseci gajenja u staklenoj bašti, a zatim su formirale i mahune (Slika 17c).



**Slika 17.** Aklimatizacija biljaka kelerabe, sorta Bečka Plava (BP). (a) Aklimatizovana BP biljka normalnog rastenja i morfologije sa zadebljalim stablom; nakon 10 meseci gajenja u staklenoj bašti biljke su procvetale (b), nakon čega su formirale mahune (c).

Protočna citometrija je urađena kod aklimatizovanih biljaka i pokazano je da nije došlo do promena u njihovoj ploidnosti.

### 4.3. Analiza endogenih biljnih hormona

Sadržaj endogenih citokinina i IAA analiziran je kod odsečaka hipokotila sa regenerisanim izdancima (HRI) kao i kod intaktnih klijanaca sa regenerisanim izdancima (KRI) koji su gajeni *in vitro* na podlogama sa različitim citokininima. Ove vrednosti su upoređene sa odgovarajućim kontrolnim vrednostima dobijenim analizom odsečaka hipokotila i intaktnih klijanaca gajenih na podlozi bez regulatora rasteñja.

#### 4.3.1. Sadržaj endogenih citokinina

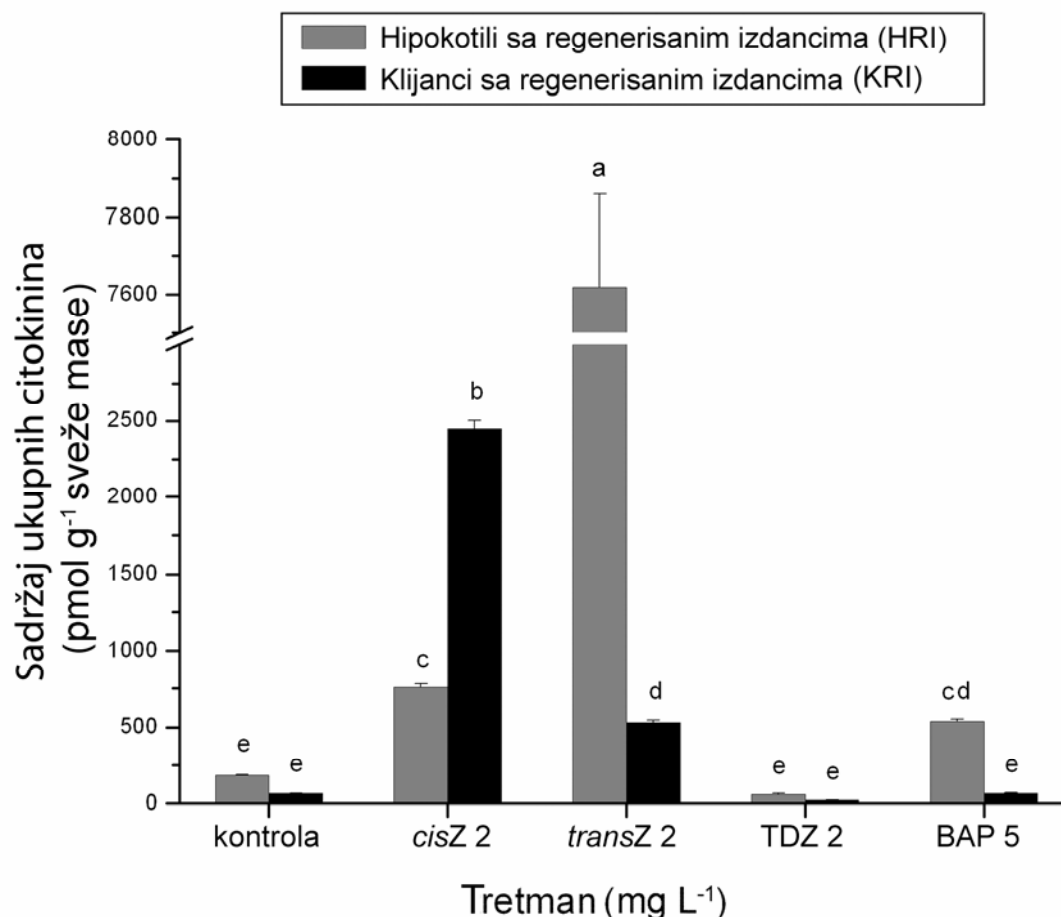
Identifikacijom i kvantifikacijom endogenih citokinina u HRI, KRI i kontroli dobijen je citokininski profil (**Grafici 6 i 7**) koji je predstavljen prema podeli citokinina koju su dali Dwivedi i saradnici (2010). Ovakva podela podrazumeva postojanje četiri grupe citokinina: bioaktivne forme citokinina (slobodne baze i ribozidi), neaktivne forme citokinina ( $N^7$ - i  $N^9$ -glukozidi), forme citokinina za skladištenje ( $O$ -glukozidi) i citokininski nukleotidi.

Kod obe sorte kelerabe dobijen je sličan citokininski profil, gde je nivo ukupnih endogenih citokinina generalno bio viši kod HRI u odnosu na KRI. Nivoi ukupnih citokinina i kod BP (**Grafik 6**) i kod BB (**Grafik 7**) su zavisili od tipa eksplantata, hranljive podloge, a uočena je i interakcija ova dva faktora. Kod BP, količina ukupnih citokinina je bila statistički značajno veća kod oba tipa eksplantata sa regenerisanim izdancima u odnosu na kontrolu za tretmane sa *cisZ* i *transZ*, kao i kod HRI gajenih na podlozi sa BAP. TDZ nije imao nikakav efekat na sadržaj ukupnih citokinina ni kod jednog tipa analiziranog tkiva (**Grafik 6**).

Kod BP, najviši nivoi svih klasa citokinina u HRI detektovani su na podlozi sa *transZ* (**Grafici 6, 8a, 9a, 10a**). Jedini izuzetak predstavljali su citokininski nukleotidi koji su najviši nivo imali kod HRI gajenim na podlozi sa *cisZ* (**Grafik 11a**). Kod KRI, najviši nivo ukupnih citokinina zabeležen je na podlozi sa *cisZ* (**Grafik 9a**). Sa druge



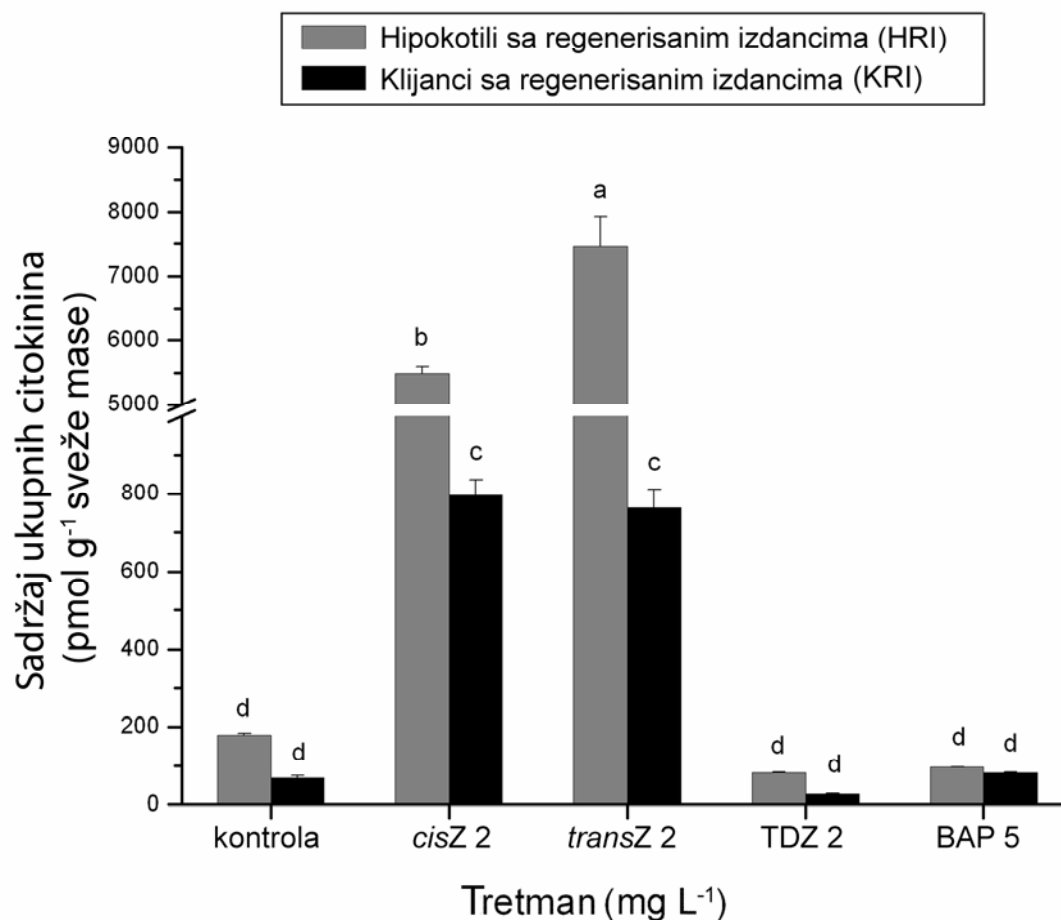
strane, najniže vrednosti nivoa svih grupa citokinina su kod svih tretmana detektovane na podlozi sa TDZ (**Grafici 6, 8a, 9a, 10a i 11a**).



**Grafik 6.** Sadržaj ukupnih citokinina (pmol g<sup>-1</sup> sveže mase) u hipokotilima sa regenerisanim izdancima (HRI) i klijancima sa regenerisanim izdancima (KRI) kelerabe, sorta Bečka Plava, nakon 6 nedelja gajenja na različitim citokininskim tretmanima. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

Slično, kod oba analizirana tipa BB tkiva, jedino je gajenje na *cis*- i *transZ* dovelo do značajnog porasta u nivoima ukupnih citokinina u poređenju sa kontrolom (**Grafik 7**). I u ovom slučaju, najviši nivoi citokinina kod HRI dostignuti su na tretmanu sa *transZ*, osim bioaktivnih formi na tretmanu sa *cisZ* (**Grafik 8b**). Kod KRI, maksimalni nivoi detektovani su ili na *cisZ* ili na *transZ* tretmanima. Slično kao kod BP, najniže vrednosti za sve klase citokinina zabeležene su i kod HRI i kod KRI

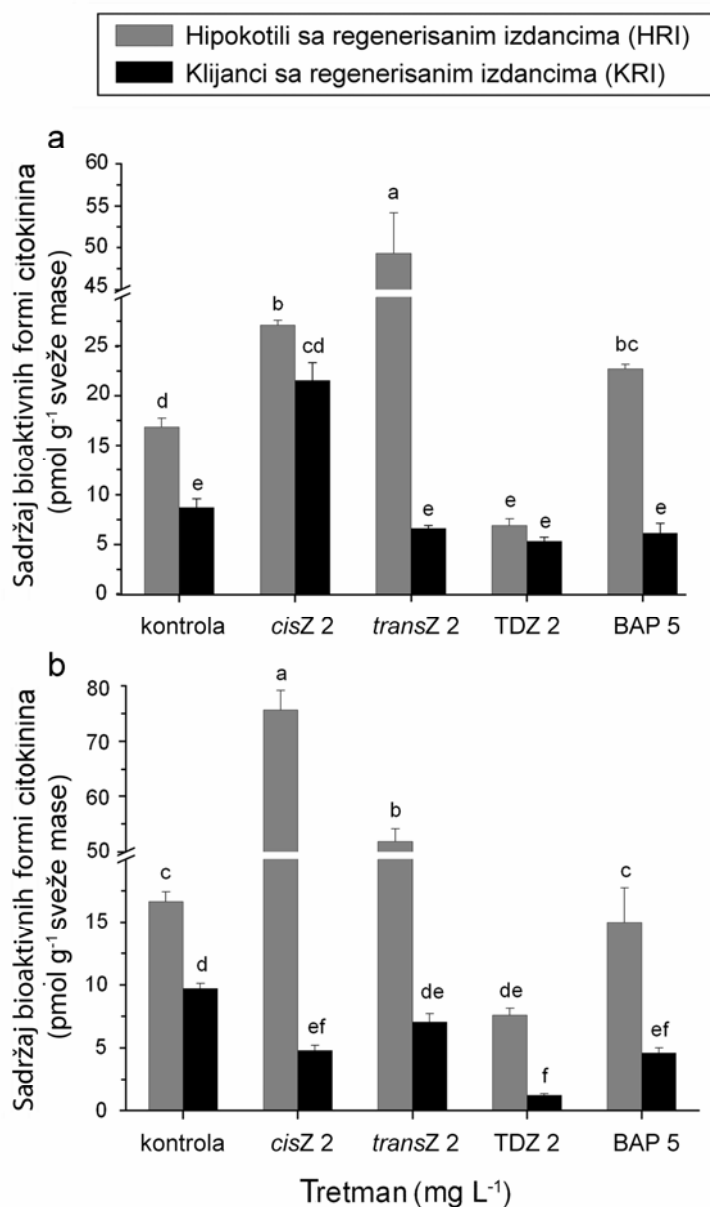
gajenim na podlozi sa TDZ (**Grafici 7, 8b, 9b, 10b i 11b**), sa izuzetkom formi citokinina za skladištenje kod KRI (**Grafik 10b**).



**Grafik 7.** Ukupan sadržaj citokinina (pmol g<sup>-1</sup> sveže mase) u hipokotilima sa regenerisanim izdancima (HRI) i klijancima sa regenerisanim izdancima (KRI) kelerabe, sorta Bečka Bela, nakon 6 nedelja gajenja na različitim citokininskim tretmanima. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

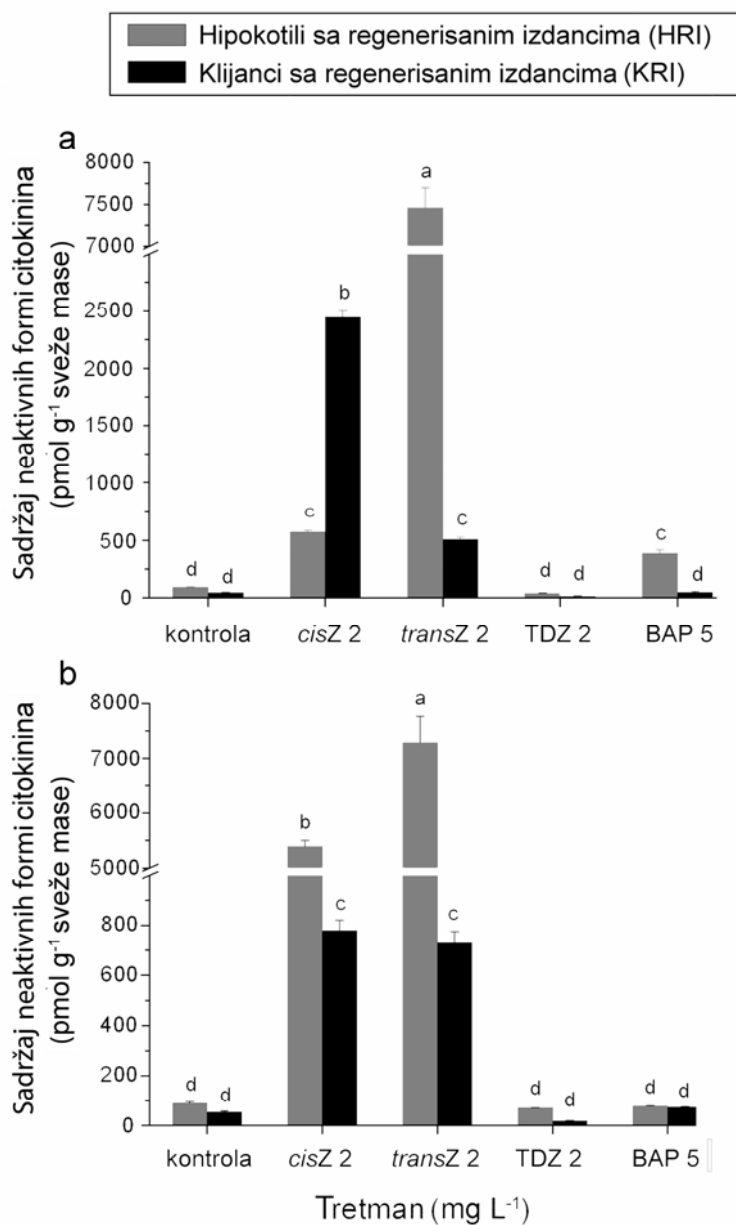
Bioaktivni citokinini (*transZ*, *cisZ*, iP, DHZ i njihovi odgovarajući ribozidi) predstavljali su samo mali deo ukupnih citokinina i kod HRI i kod KRI obe sorte kelerabe. Statistička analiza je pokazala da se vrednosti dobijene za BP HRI gajene na svim podlogama obogaćenim citokininima značajno razlikuju od kontrolnih vrednosti. Te vrednosti su bile više na *cisZ*, *transZ* i BAP a niže na TDZ. Kod KRI, jedino je tretman sa *cisZ* doveo do značajnog povećanja u nivoima bioaktivnih citokininskih formi u odnosu na kontrolu (**Grafik 8a**). Za HRI sorte BB (**Grafik 8b**) zabeležena je

slična raspodela bioaktivnih citokinina kao i kod BP. Međutim, prisustvo *cisZ*, TDZ i BAP u hranljivim podlogama umanjio je nivo bioaktivnih citokinina kod KRI.



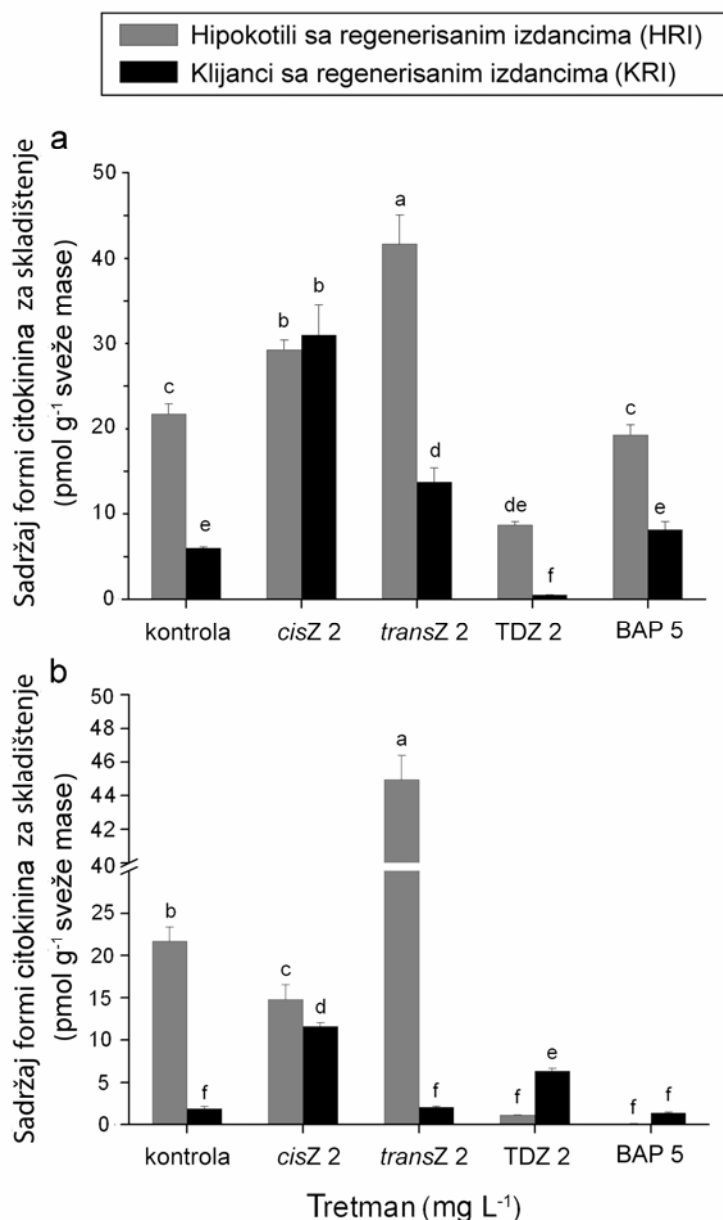
**Grafik 8.** Sadržaj bioaktivnih formi citokinina (pmol g<sup>-1</sup> sveže mase) u hipokotilima sa regenerisanim izdancima (HRI) i klijancima sa regenerisanim izdancima (KRI) nakon 6 nedelja gajenja na različitim citokininskim tretmanima kod kelerabe, sorte Bečka Plava (a), odnosno Bečka Bela (b). Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

Neaktivne forme citokinina ( $N^7$ - i  $N^9$ -glukozidi) predstavljaju preovlađujuće citokininske forme u svim ispitivanim tkivima (**Grafik 9**) i dobijene vredosti u potpunosti korelišu sa raspodelom ukupnih citokinina (**Grafici 6 i 7**).



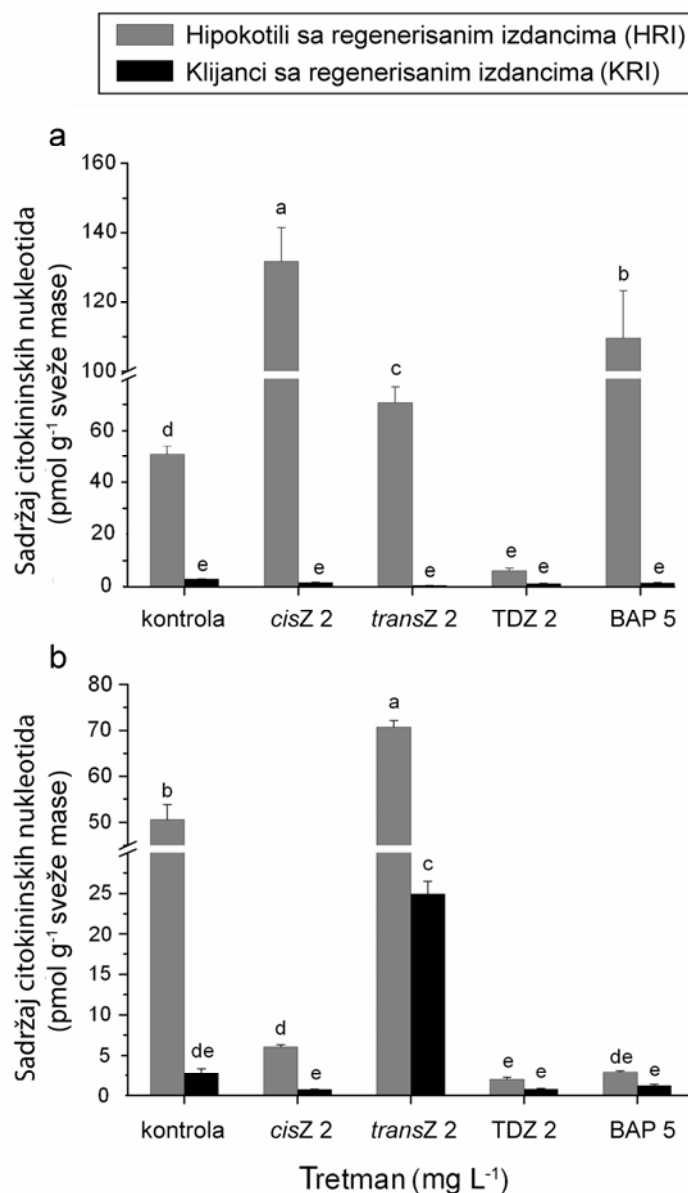
**Grafik 9.** Sadržaj neaktivnih formi citokinina (pmol g<sup>-1</sup> sveže mase) u hipokotilima sa regenerisanim izdancima (HRI) i klijancima sa regenerisanim izdancima (KRI) nakon 6 nedelja gajenja na različitim citokininskim tretmanima kod kelerabe, sorte Bečka Plava (a), odnosno Bečka Bela (b). Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

Takođe, za forme citokinina za skladištenje (*O*-glukozidi) zabeležene su očigledne razlike u zavisnosti od tretmana, eksplantatskog tkiva kao i međusobne interakcije ova dva faktora i kod BP (**Grafik 10a**) i kod BB (**Grafik 10b**).



**Grafik 10.** Sadržaj formi citokinina za skladištenje (pmol g<sup>-1</sup> sveže mase) u hipokotilima sa regenerisanim izdancima (HRI) i klijancima sa regenerisanim izdancima (KRI) nakon 6 nedelja gajenja na različitim citokininskim tretmanima kod kelerabe, sorte Bečka Plava (a), odnosno Bečka Bela (b). Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

Citokininski nukleotidi-monofosfati predstavljaju malu frakciju ukupnog citokininskog sadržaja, i analiza je pokazala postojanje razlika u njihovim profilima između dva tipa eksplantata kod oba genotipa. **Grafik 11** pokazuje značajno manju količinu ove grupe citokinina kod KRI u poređenju sa HRI za sve primenjene tretmane.



**Grafik 11.** Sadržaj citokininskih nukleotida (pmol g<sup>-1</sup> sveže mase) u hipokotilima sa regenerisanim izdancima (HRI) i kljancima sa regenerisanim izdancima (KRI) nakon 6 nedelja gajenja na različitim citokininskim tretmanima kod kelerabe, sorta Bečka Plava (a), odnosno Bečka Bela (b). Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti p ≤ 0,05.

Endogeni citokinini se na osnovu strukture bočnog lanca mogu kategorizovati u četiri tipa citokinina (Aremu i sar. 2014a): *cisZ* tip (*cisZ*, *cisZR*, *cisZ7G*, *cisZ9G*, *cisZOG*, *cisZROG*, *cisZRMP*); *transZ* tip (*transZ*, *transZR*, *transZ7G*, *transZ9G*, *transZOG*, *transZROG*, *transZRMP*); DHZ tip (DHZ, DHZR, DHZ7G, DHZ9G, DHZOG, DHZROG, DHZMP) i iP tip (iP, iPR, iP7G, iP9G, iPRMP).

Statistička analiza pokazala je da su nivoi sva četiri tipa citokinina zavisila kako od vrste analiziranog tkiva i primenjenog tretmana, tako i od interakcije ova dva faktora (Tabela 17).

**Tabela 17.** Endogeni sadržaj citokinina ( $\text{pmol g}^{-1}$  sveže mase) u hipokotilima sa regenerisanim izdancima (HRI) i klijancima sa regenerisanim izdancima (KRI) kod dve sorte kelerabe, Bečka Plava (BP) i Bečka Bela (BB) nakon 6 nedelja gajenja na podlogama sa različitim citokininima (citokinini su grupisani na osnovu strukture bočnog lanca na *transZ*-, *cisZ*-, DHZ- i iP-tip)

Uzo- rak	Egzogeni citokinin ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Endogeni sadržaj ukupnih citokinina određenog tipa ( $\text{pmol g}^{-1}$ sveže mase)			
		<i>cisZ</i> tip	<i>transZ</i> tip	DHZ tip	iP tip
<b>BP</b>					
HRI	0	42,00 ± 1,31 d	52,85 ± 1,15 d	30,80 ± 0,87 cd	56,85 ± 2,62 b
	<i>cisZ</i> 2	6847,75 ± 113,04 a	550,65 ± 18,98 b	109,30 ± 10,56 b	69,18 ± 6,13 b
	<i>transZ</i> 2	578,35 ± 38,02 c	6551,40 ± 202,35 a	453,22 ± 22,68 a	36,35 ± 6,73 c
	TDZ 2	32,75 ± 0,95 d	14,25 ± 2,11 d	3,20 ± 0,40 e	10,55 ± 0,66 de
	BAP 5	12,20 ± 0,68 d	283,43 ± 21,56 c	83,90 ± 11,43 b	159,53 ± 10,01 a
KRI	0	31,20 ± 2,74 d	19,35 ± 2,35 d	0,20 ± 0,00 e	14,10 ± 0,46 de
	<i>cisZ</i> 2	2339,55 ± 56,80 b	69,55 ± 3,30 d	17,67 ± 0,10 de	22,70 ± 1,65 d
	<i>transZ</i> 2	65,15 ± 5,39 d	413,70 ± 5,03 bc	43,15 ± 4,29 c	9,45 ± 0,66 e
	TDZ 2	13,62 ± 0,60 d	2,20 ± 0,25 d	4,70 ± 0,33 e	2,45 ± 0,15 e
	BAP 5	49,12 ± 5,69 d	4,20 ± 0,17 d	2,90 ± 0,29 e	8,80 ± 0,25 e
<b>BB</b>					
HRI	0	42,15 ± 1,49 d	51,05 ± 2,60 c	30,55 ± 2,77 bc	53,60 ± 4,62 a
	<i>cisZ</i> 2	4563,37 ± 102,31 a	831,15 ± 3,58 b	49,37 ± 4,82 b	44,22 ± 3,06 b
	<i>transZ</i> 2	577,75 ± 55,07 c	6394,60 ± 397,10 a	451,70 ± 22,51 a	34,00 ± 2,42 c
	TDZ 2	42,90 ± 3,28 d	27,00 ± 1,84 c	3,67 ± 1,11 d	8,45 ± 0,32 fg
	BAP 5	35,90 ± 0,84 d	22,10 ± 2,25 c	7,00 ± 0,09 d	31,40 ± 0,87 c
KRI	0	32,70 ± 3,96 d	5,20 ± 0,31 c	7,70 ± 0,57 d	23,05 ± 1,14 d
	<i>cisZ</i> 2	730,90 ± 47,34 b	51,50 ± 5,25 c	4,75 ± 1,85 d	9,75 ± 0,52 f
	<i>transZ</i> 2	43,32 ± 3,16 d	730,64 ± 43,69 b	13,73 ± 0,84 cd	18,78 ± 2,36 de
	TDZ 2	23,40 ± 1,22 d	0,00 ± 0,00 c	1,75 ± 0,03 d	2,55 ± 0,10 g
	BAP 5	59,75 ± 2,95 d	2,85 ± 0,66 c	2,55 ± 0,07 d	16,40 ± 2,19 e

Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

U većini slučajeva, vrednosti su bile više kod HRI, kao što je već opisano za distribuciju citokinina na osnovu fiziološke funkcije. Na podlozi sa *cisZ* najviše je bio zastupljen *cisZ* tip citokinina, dok su *transZ* i DHZ tipovi imali najviše vrednosti na podlozi obogaćenju sa *transZ*. Ova pojava se odnosila i na HRI i na KRI obe sorte kelerabe iako je efekat egzogeno dodatih citokinina na sadržaj endogenih citokinina generalno bio više izražen kod HRI. Pored toga, kod HRI je bio više izražen efekat primenjenog *transZ* na nivo endogenog *cisZ* tipa citokinina, kao i efekat primenjenog *cisZ* na nivo endogenih *transZ* i DHZ tipova citokinina. Uočeno je da je endogeni sadržaj iP tipa bio ili snižen ili povišen pod uticajem citokininskih tretmana kod BP, dok je kod BB svuda bio snižen (**Tabela 17**). TDZ tretman je uglavnom doprineo smanjenju sadržaja sva četiri tipa citokinina kod obe sorte, dok je efekat BAP na endogene nivoe različitih tipova citokinina bio veoma varijabilan.

### 4.3.2. Endogeni sadržaj IAA i odnos IAA / bioaktivne forme citokinina

Endogeni nivo indol-3-sirćetne kiseline (IAA) određen je kod obe sorte kelerabe i dobijeni su uporedivi rezultati (**Tabela 18**). I kod BP i kod BB analiza je pokazala da je došlo do statistički značajnog porasta endogenog nivoa IAA u oba tipa eksplantata gajenih na podlogama sa citokininima u poređenju sa kontrolom. Izuzetak su predstavljali BP HRI gajeni na TDZ kao i BP KRI gajeni na podlogama sa *cisZ* ili sa BAP, kod kojih nisu zabeležene značajne razlike u odnosu na kontrolno tkivo. Najviši nivo endogene IAA je izmeren kod uzoraka gajenih na  $2 \text{ mg L}^{-1}$  *transZ*.

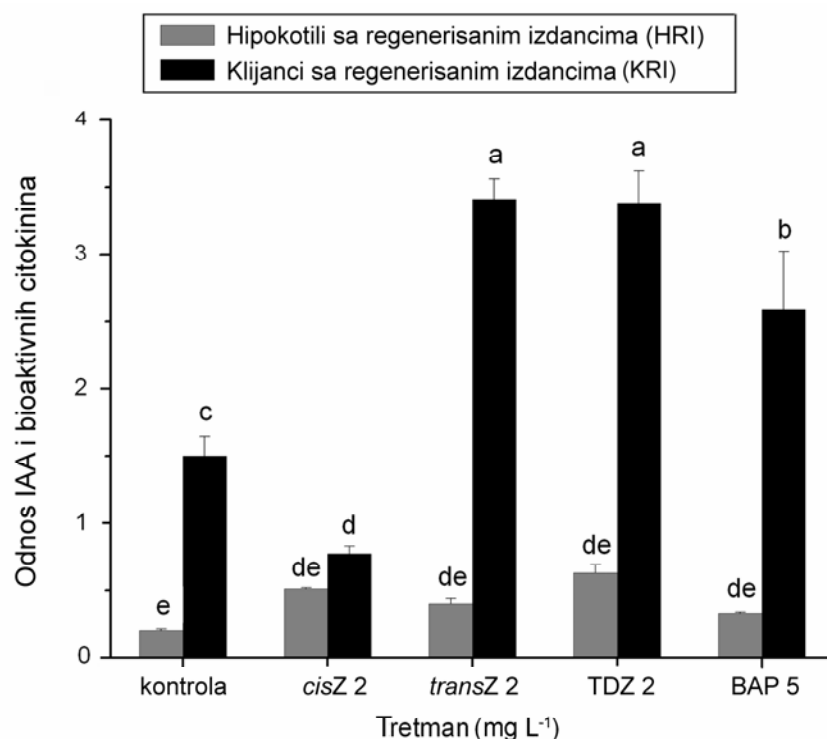
Analiziran je odnos IAA i bioaktivnih formi citokinina, pri čemu su uočeni slični obrasci kod obe sorte (**Grafici 12 i 13**). Kod KRI odnos IAA / bioaktivne forme citokinina je u većini slučajeva bio povećan na podlogama za regeneraciju u odnosu na kontrolu. Sa druge strane, kod HRI nije zabeležena značajna promena u datom odnosu, osim kod BB eksplantata sa izdancima koji su gajeni na podlozi sa TDZ. Vrednosti kod BP sorte (**Grafik 12**) su uglavnom bile snižene u odnosu na BB (**Grafik 13**).



**Tabela 18.** Endogeni sadržaj IAA (pmol g<sup>-1</sup> sveže mase) u hipokotilima sa regenerisanim izdancima (HRI) i klijancima sa regenerisanim izdancima (KRI) kod dve sorte kelerabe, Bečka Plava (BP) i Bečka Bela (BB) nakon 6 nedelja gajenja na podlogama sa različitim citokinima

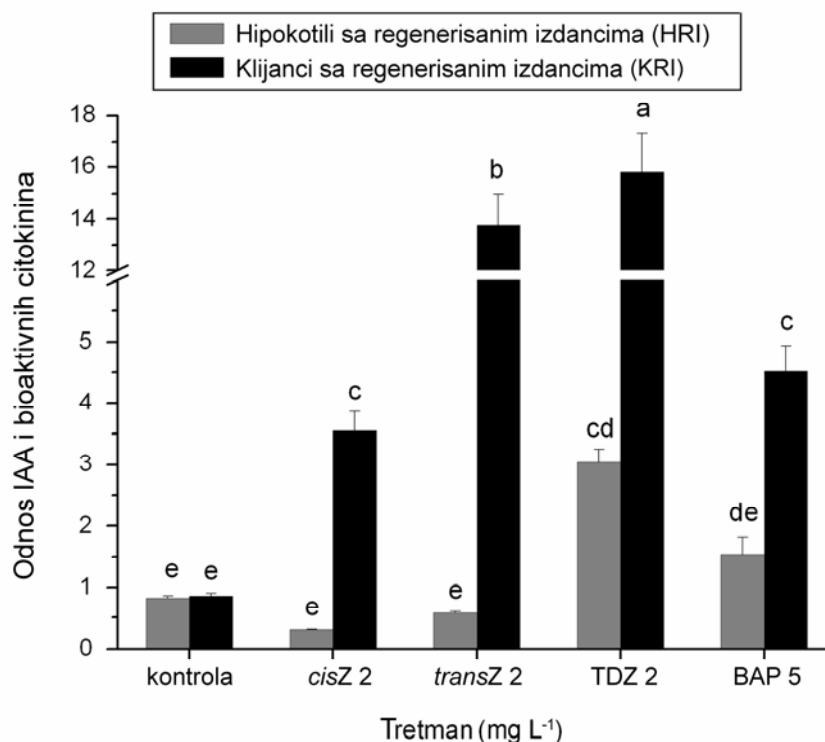
Vrsta tkiva	Egzogeni citokin (mg L <sup>-1</sup> )	Endogeni sadržaj IAA (pmol g <sup>-1</sup> sveže mase)	
		BP	BB
HRI	0	3,36 ± 0,21 g	13,63 ± 1,73 de
	<i>cisZ</i> 2	23,91 ± 1,15 a	22,34 ± 2,31 bc
	<i>transZ</i> 2	19,84 ± 2,31 bcd	29,88 ± 2,60 a
	TDZ 2	4,22 ± 0,13 g	22,79 ± 2,88 b
	BAP 5	20,53 ± 1,15 abc	20,80 ± 2,77 bc
KRI	0	13,09 ± 1,73 f	8,33 ± 1,15 e
	<i>cisZ</i> 2	16,22 ± 1,28 def	16,68 ± 1,83 cd
	<i>transZ</i> 2	22,35 ± 1,73 ab	21,11 ± 1,15 bc
	TDZ 2	17,70 ± 1,15 cde	18,45 ± 0,71 bcd
	BAP 5	14,68 ± 0,97 ef	20,30 ± 1,73 bc

Prikazani podaci predstavljaju srednje vrednosti ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se statistički značajno ne razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti p ≤ 0,05.



**Grafik 12.** Odnos endogenog nivoa indol-3-sirćetne kiseline (IAA) i ukupnih bioaktivnih citokinina u hipokotilima sa regenerisanim izdancima (HRI) i klijancima sa

regenerisanim izdancima (KRI) kelerabe, sorta Bečka Plava, nakon 6 nedelja gajenja na različitim citokininskim tretmanima. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Srednje vrednosti obeležene različitim slovom se statistički značajno razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .



**Grafik 13.** Odnos endogenog nivoa indol-3-sirćetne kiseline (IAA) i ukupnih bioaktivnih citokinina u hipokotilima sa regenerisanim izdancima (HRI) i klijancima sa regenerisanim izdancima (KRI) kelerabe, sorta Bečka Bela, nakon 6 nedelja gajenja na različitim citokininskim tretmanima. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). Srednje vrednosti obeležene različitim slovom se statistički značajno razlikuju prema testu najmanjih značajnih razlika (LSD), na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

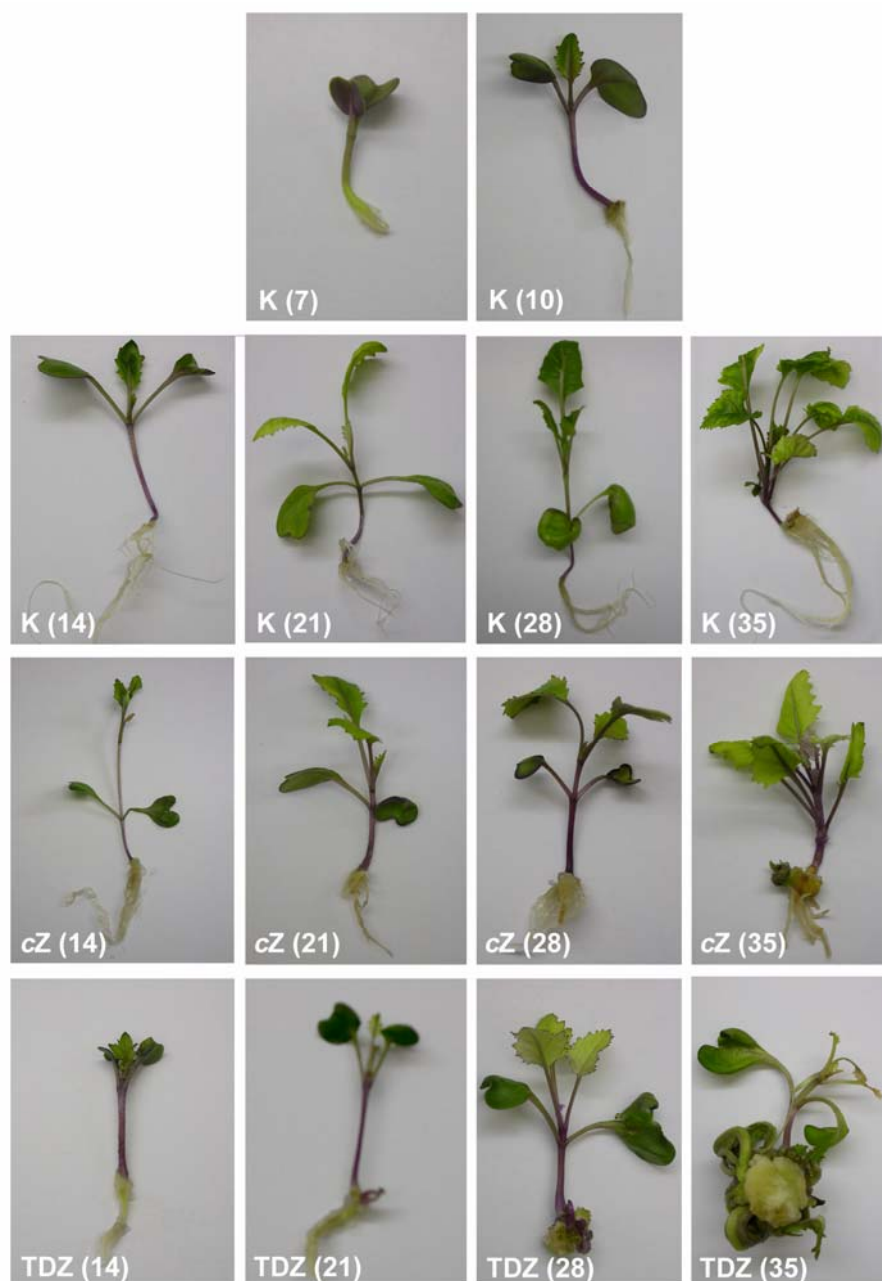
Takođe, odnosi su većinom bili značajno manji kod HRI u poređenju na KRI. Najviše vrednosti kod KRI obe sorte uočene su na tretmanima sa TDZ, što je u korelaciji sa relativno niskim nivoima citokinina u eksplantatima gajenim na hranljivim podlogama sa TDZ. Najniži odnosi IAA / bioaktivne forme citokinina pokazani su ili kod tretmana sa *cisZ* (BP KRI, BB HRI) ili kod kontrole (BP hipokotili, BB klijanci).

#### 4.4. Određivanje nivoa ekspresije gena uključenih u ćelijski ciklus kelerabe tokom procesa organogeneze *in vitro*

Nivo ekspresije gena *CDKB2;1*, *CYCB2;4* i *CYCH;1* ispitivan je pomoću qRT-PCR analize u klijancima BP kelerabe nakon 7, 10, 14, 21, 28 i 35 dana gajenja na hranljivim podlogama u koje su dodati pojedinačni citokinini. Kao kontrola korišćene su biljke isključavane na osnovnoj hranljivoj podlozi.

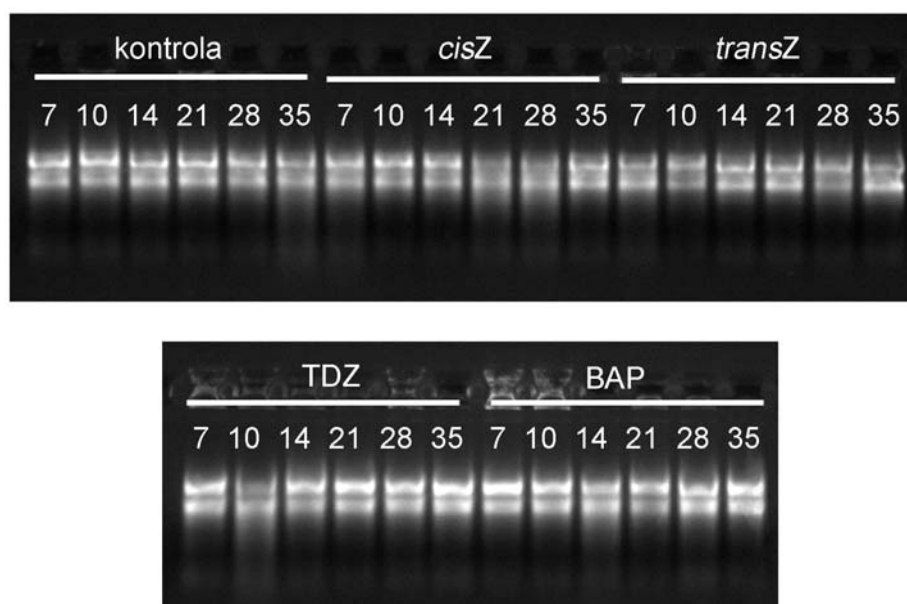
Semena kelerabe su posle 2-4 dana gajenja isključavala, a nakon 7 dana na svim tretmanima bili su formirani klijanci na stadijumu dva kotiledona (**Slika 18**). Tretirani klijanci su izgledali slično kontrolnim. Nakon 10 dana gajenja biljke gajene na *cisZ* i *transZ* su bile sličnog izgleda i nisu se razlikovale od kontrolnih. Sa druge strane, mogla se uočiti razlika između kontrolnih biljaka i onih gajenih na TDZ i BAP (**Slika 18**).

Prva pojava kalusa u osnovi stabla zabeležena je posle 14 dana kod biljaka gajenih na podlogama sa TDZ (**Slika 18**) i BAP. Generalno, kod biljaka tretiranih TDZ i BAP zapažen je mali koren, manji broj listova kao i deblje stablo (naročito izraženo kod BAP) u odnosu na kontrolu i zeatinski tretman. Formiranje kalusa kod biljaka gajenih na zeatinu je zabeleženo nakon 21 dana gajenja, kada je kod biljaka tretiranih BAP i TDZ došlo do regeneracije u vidu pojave pupoljaka na kalusu. Posle 28 dana, na podlozi sa *transZ* je takođe došlo do pojave pupoljaka, a kod biljaka gajenih na TDZ i BAP došlo je do uvećanja kalusa i broja pupoljaka. Kod biljaka gajenih na *cisZ* regeneracija se mogla uočiti posle 35 dana, kada je kod BAP i TDZ tretiranih biljaka već bio prisutan veliki broj izraslih izdanaka na kalusu (**Slika 18**).



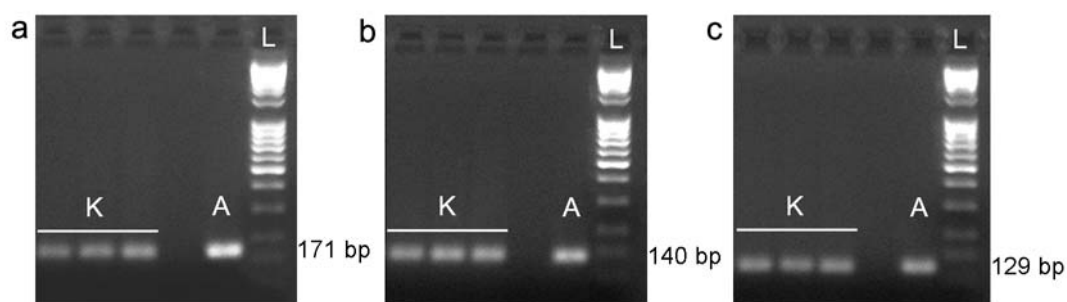
**Slika 18.** Biljke kelerabe, sorta Bečka Plava, gajene na osnovnoj hranljivoj podlozi – K, na podlozi sa  $2 \text{ mg L}^{-1}$  *cisZ* – cZ i podlozi sa  $2 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ – TDZ, i pojava *de novo* organogeneze u određenim vremenskim tačkama. Vreme gajenja (dani) je prikazano u zagradi.

Iz sakupljenog biljnog materijala izolovana je ukupna RNK. Kvalitet izolovanih RNK je proveren na agaroznom gelu. Pokazano je da su izolovane RNK bile zadovoljavajućeg kvaliteta i koncentracije (Slika 19).



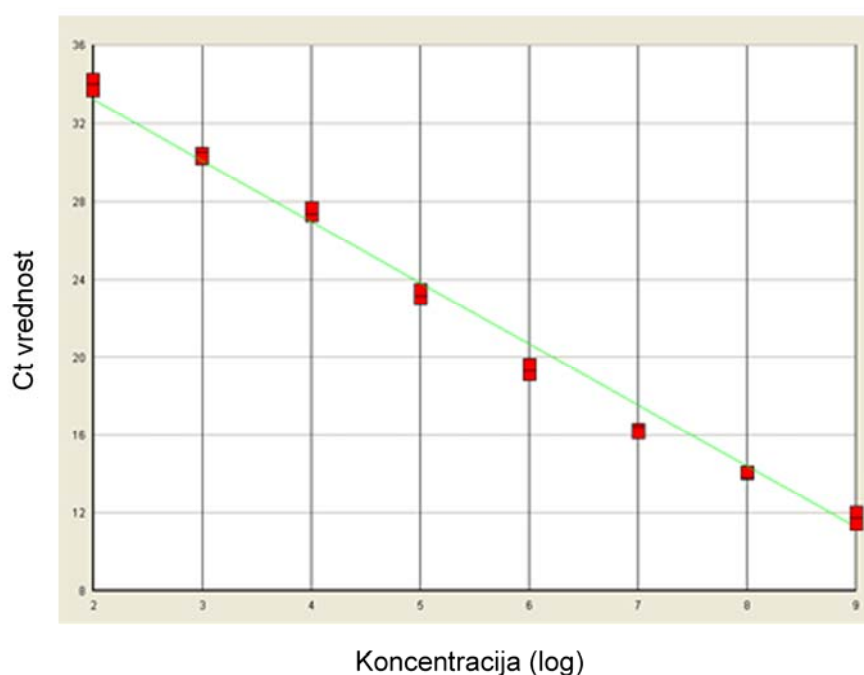
**Slika 19.** RNK (2  $\mu\text{g}$  po bunariću) izolovane iz biljaka kelerabe, sorta Bečka Plava, gajenih 7, 10, 14, 21, 28 i 35 dana na hranljivim podlogama sa 2  $\text{mg L}^{-1}$  cisZ; 2  $\text{mg L}^{-1}$  transZ<sup>1</sup>; 2  $\text{mg L}^{-1}$  TDZ, odnosno 5  $\text{mg L}^{-1}$  BAP. Kontrolne biljke su gajene na osnovnoj hranljivoj podlozi.

Nakon izolacije, urađena je reverzna transkripcija RNK BP kelerabe kao i amplifikacija upotrebom specifičnih prajmera (**Slika 20**). Takođe, na **Slici 20** pokazano je podudaranje veličine dobijenih amplikona kelerabe sa amplikonima iz *A. thaliana* koji su služili kao kontrola specifičnosti upotrebljenih prajmera. Produkti PCR amplifikacije kelerabe su ekstrahovani iz agaroznog gela nakon gel elektroforeze, i kvantifikovani pomoću spektrofotometra. Nakon sekvenciranja ovih produkata PCR amplifikacije kod kelerabe pokazano je postojanje visokog stepena homologije sa sekvencama odgovarajućih gena iz *A. thaliana* odnosno krompira. Za gen *CDKB2;1* (GenBank™ pristupni br. NM\_106304) podudaranje sa sekvencom iz *A. thaliana* iznosilo je 94%, za gen *CYCB2;4* (GenBank™ pristupni br. NM\_106281) 88%, a za gen *CYCH;1* (GenBank™ pristupni br. NM\_122644) 94%. Takođe, pokazano je postojanje homologije datih gena sa odgovarajućim sekvencama za koje se pretpostavlja da odgovaraju vrsti *Brassica rapa*, i to od 97% za gen *CDKB2;1*, 96% za gen *CYCB2;4* i 98% za gen *CYCH;1*. Za aktinski gen (GenBank™ pristupni br. X55749) podudaranje sa sekvencom iz krompira iznosilo je 86%, odnosno 92% sa predviđenom sekvencom iz *B. rapa*.



**Slika 20.** Amplikoni dobijeni reverznom transkripcijom i amplifikacijom cDNK upotrebom specifičnih prajmera za sekvencu gena *CDKB2;1* (a), *CYCB2;4* (b) i *CYCH;1* (c). Dobijeni gelovi su korišćeni za ekstrakciju produkata PCR amplifikacije kelerabe. K – keleraba, A – *A. thaliana*, L – DNK marker.

Za svaki gen praćen qRT-PCR analizom napravljena je serija razblaženja od  $10^9$  do  $10^2$  kopija/ $\mu$ l. Dobijena razblaženja korišćena su kao standardi pomoću kojih su konstruisane standardne krive (**Slika 21**).

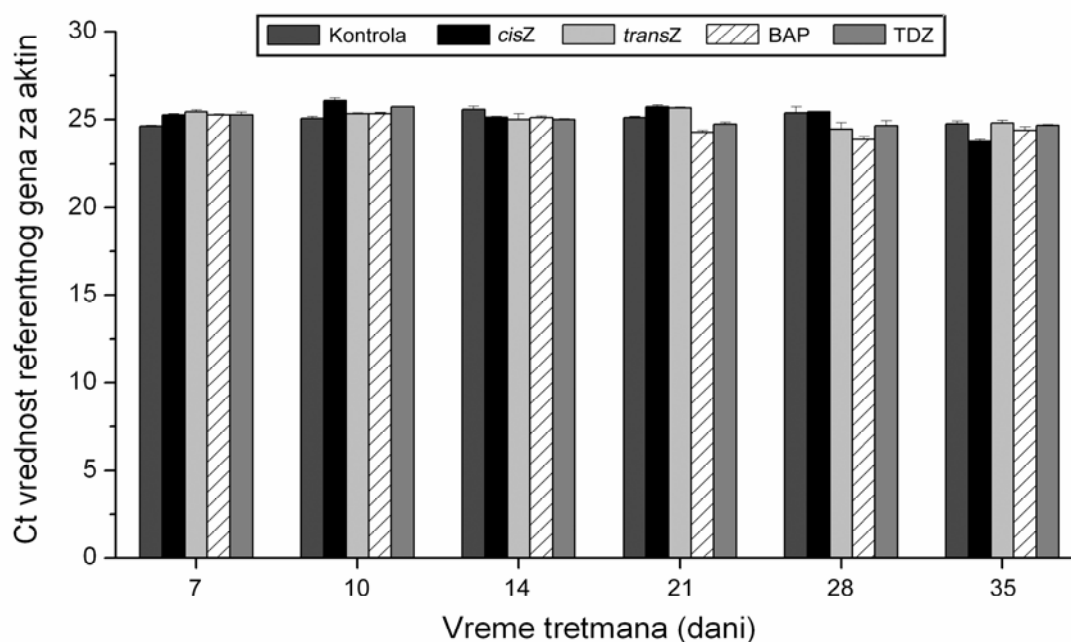


**Slika 21.** Primer standardne krive poznate koncentracije amplifikovanih PCR produkata *CDKB2;1* gena.

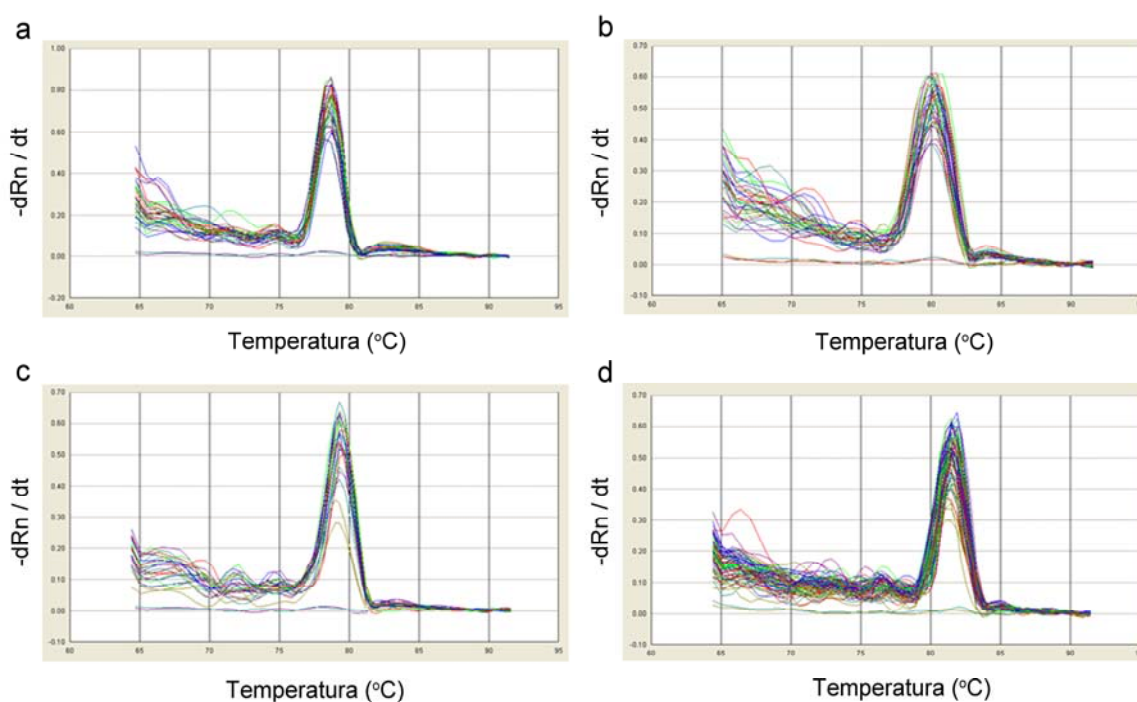
Ujednačena količina ukupne cDNK svih uzoraka u toku qPCR analize potvrđena je paralelnom amplifikacijom referentnog gena za *PoAc58*. Ovaj gen kodira aktin kod krompira i konstitutivno se eksprimira. Prosečan broj ciklusa posle kojih je dostignut

prag detekcije (Ct vrednost) referentnog gena za aktin kod svih analiziranih uzoraka bio je ujednačen, što pokazuje **Grafik 14**.

Analizom krive topljenja pokazana je specifičnost amplifikacije *CDKB2;1*, *CYCB2;4*, *CYCH;1* kao i *PoAc58* gena kod svih analiziranih uzoraka. Krive topljenja su bile bez odstupanja, sa maksimumom vrednosti  $-dRn/dT$  dostignutim u istom temperaturnom opsegu, koji je iznosio 78,3-78,7 °C za *CDKB2;1* (**Slika 22a**), 79,6-80,4 °C za *CYCB2;4* (**Slika 22b**), 79-79,7 °C za *CYCH;1* (**Slika 22c**), 81,1-81,9 °C za aktin (**Slika 22d**).



**Grafik 14.** Broj ciklusa posle kojih se dostiže prag detekcije amplifikacije (Ct vrednost) sekvence referentnog gena *PoAc58* prilikom qPCR amplifikacije cDNK biljaka kelerabe gajenih *in vitro* 7, 10, 14, 21, 28 i 35 dana na različitim citokininskim tretmanima. Kontrolne biljke su gajene na osnovnoj hranljivoj podlozi. Prikazani podaci predstavljaju srednju Ct vrednost  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ).

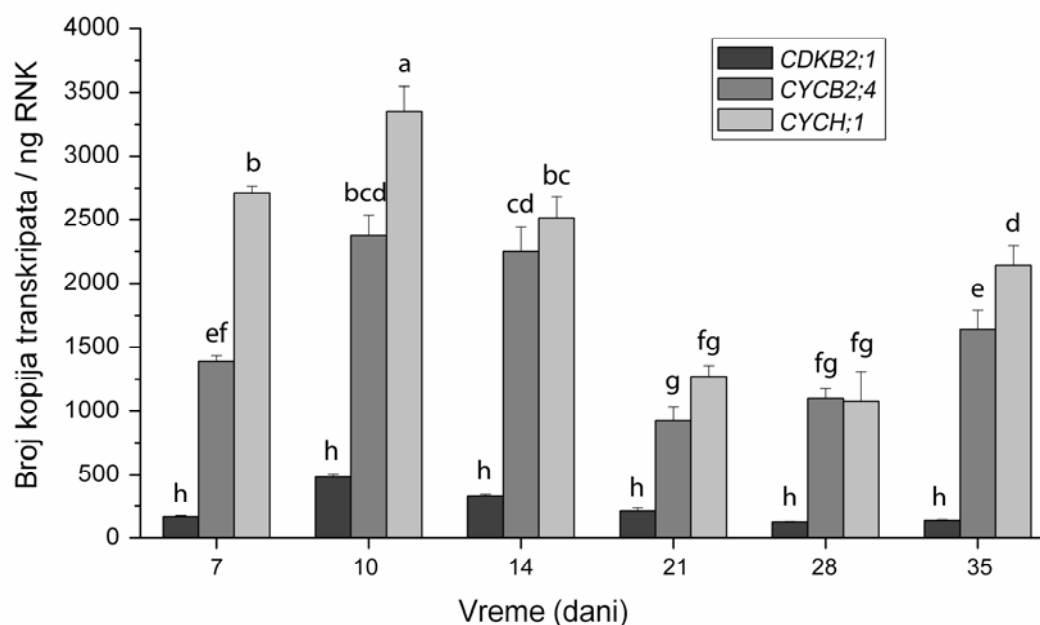


**Slika 22.** Krive topljenja produkata qPCR amplifikacije cDNK biljaka kelerabe, sorta Bečka Plava, tretiranih citokininima, pomoću prajmera specifičnih za sekvencu gena *CDKB2;1* (a), *CYCB2;4* (b), *CYCH;1* (c) i *PoAc58* (d).

Metodom qPCR-a pokazan je uticaj citokininskih tretmana na aktivnost sva tri gena uključena u regulaciju ćelijske deobe kod BP kelerabe. Dobijeni rezultati predstavljeni su relativno u odnosu na kontrolne biljke gajene na osnovnoj hranljivoj podlozi, za svaku vremensku tačku ponaosob. Kod kontrolnih biljaka, sva tri gena su pokazala sličan profil promene ekspresije u toku vremena (**Grafik 15**). U svim vremenskim tačkama kod kontrolnih biljaka najniža ekspresija zabeležena je za *CDKB2;1* gen. Dodatno, nije uočena statistički značajna promena ekspresije ovog gena tokom vremena, za razliku od ekspresije *CYCB2;4* i *CYCH;1* gena kod kojih je najviša vrednost broja kopija transkripata / ng RNK dostignuta nakon 10 dana gajenja (**Grafik 15**).

Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala da su vreme gajenja i tip citokininskog tretmana imale statistički značajan uticaj na relativnu promenu ekspresije sva tri gena, kao i da je postojala interakcija ova dva faktora (**Grafik 16**).

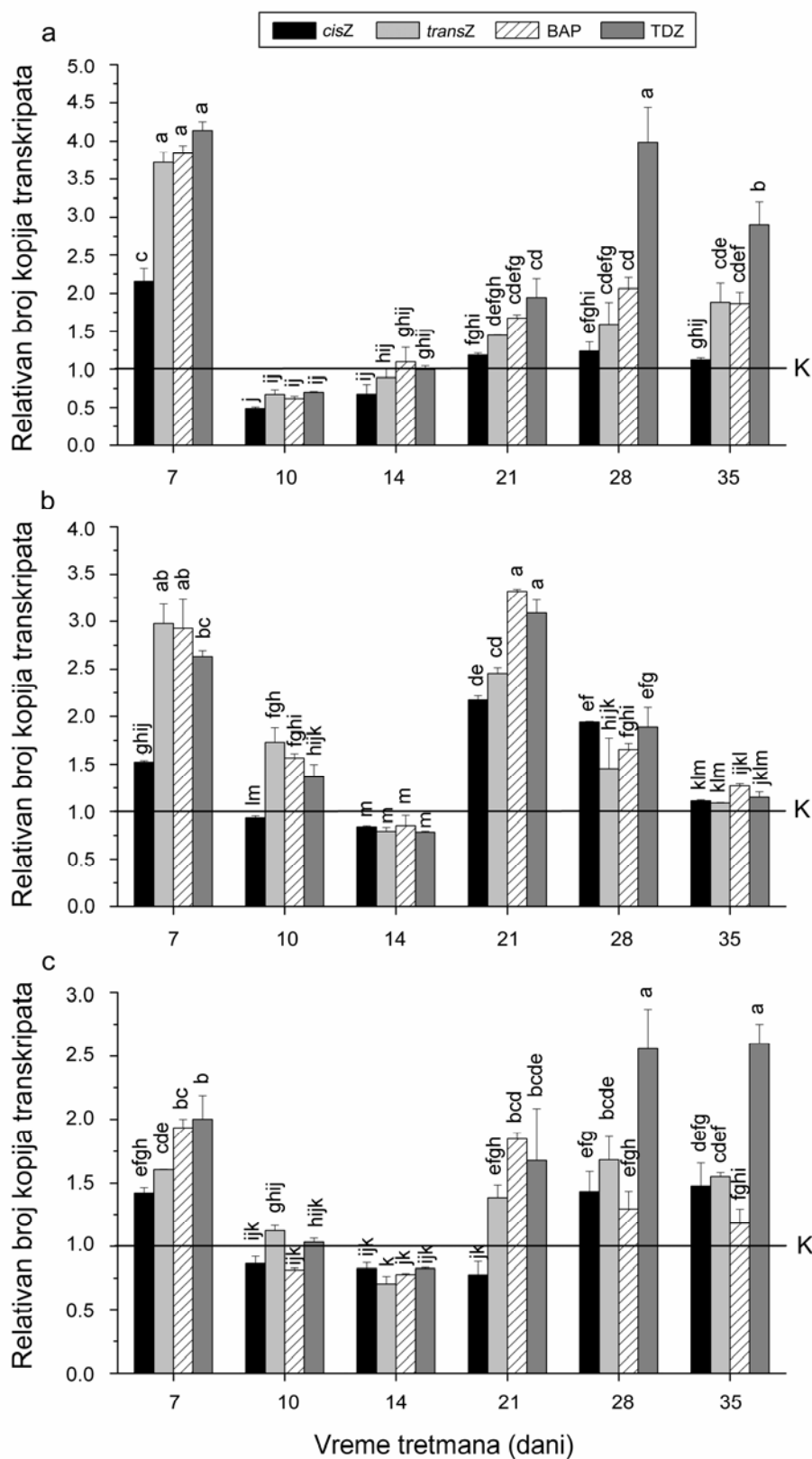




**Grafik 15.** Broj kopija transkripata (po 1 ng RNK) *CDKB2;1*, *CYCB2;4* i *CYCH;1* gena u kontrolnim biljkama kelerabe, sorta Bečka Plava, gajenih *in vitro* 7, 10, 14, 21, 28, i 35 dana na osnovnoj hranljivoj podlozi. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene istim slovom se ne razlikuju statistički značajno prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

Najveći relativni porast ekspresije *CDKB2;1* gena (**Grafik 16a**) pod uticajem citokinina zabeležen je nakon 7 dana gajenja, pri čemu je uočeno povećanje relativnog sadržaja transkripata do 4 puta u odnosu na netretiranu kontrolu. Rezultati prikazani na **Grafiku 16b** pokazuju sličan obrazac ekspresije i kod *CYCB2;4* pri čemu je najveći statistički značajan porast ekspresije (oko 3 puta) u odnosu na kontrolu zabeležen nakon 7 i 21 dana gajenja kod sva 4 tretmana.

U trenutku kada je došlo do pojave prvog kalusa, nivo ekspresije oba gena bio je značajno niži u odnosu na nivo ekspresije kod kontrole na svim tretmanima. Sa pojavom regenerisanih izdanaka i njihovog daljeg rastenja i razvića, došlo je do blagog porasta aktivnosti *CDKB2;1* gena, naročito kod TDZ tretmana nakon 28 dana, gde se dobijena vredost značajno razlikovala od onih dobijenih na ostalim tretmanima. Zabeleženi porast ekspresije je još više bio izražen kod *CYCB2;4* gena, i to najviše nakon 21 dana gajenja gde je promena ekspresije dobijene na podlogama sa TDZ i BAP bila statistički značajna u odnosu na druge citokinine.



**Grafik 16.** qRT-PCR analiza ekspresije gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa kod biljaka kelerabe, sorta Bečka Plava, nakon 7, 10, 14, 21, 28, i 35 dana gajenja *in*

*in vitro* na podlozi sa 2 mg L<sup>-1</sup> *cisZ*; 2 mg L<sup>-1</sup> *transZ*; 2 mg L<sup>-1</sup> TDZ, odnosno 5 mg L<sup>-1</sup> BAP. Količina transkripta *CDKB2;1* (a), *CYCB2;4* (b) i *CYCH;1* (c) prikazana je kao relativan broj kopija u odnosu na kontrolne vrednosti (K) za svaku vremensku tačku. Kontrolne biljke su gajene na osnovnoj hranljivoj podlozi. Prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E. (n = 3). Srednje vrednosti obeležene različitim slovom se statistički značajno razlikuju prema LSD testu, na nivou značajnosti  $p \leq 0,05$ .

Na **Grafiku 16c** se može videti da ekspresija *CYCH;1* gena kod kelerabe prati obrazac ekspresije *CDKB2;1* i *CYCB2;4* gena tokom vremena. Najveće statistički značajne promene u ekspresiji u odnosu na kontrolu uočene su kod tretmana sa TDZ nakon 28 i 35 dana gajenja.

## 5. DISKUSIJA

Razvijanje efikasnog protokola za *in vitro* regeneraciju biljaka, kod određenih biljnih vrsta, predstavlja preduslov za brojne eksperimentalne pristupe u modernoj biljnoj fiziologiji, biotehnologiji kao i u genetičkom inženjerstvu.

Jedini uspješni protokol za regeneraciju biljaka kelerabe *in vitro* publikovan do sada (Glendening i Sjolund 1988) zahtevao je upotrebu izuzetno visoke koncentracije citokinina BAP ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) koja može da dovede do brojnih neželjenih efekata kao što su inhibicija ožiljavanja, problemi sa aklimatizacijom ili pojava morfoloških abnormalnosti (Werbrouck 1996). Takođe su zabeleženi pokušaji koji su vodili ka slaboj regeneraciji (Klima i sar. 2004). Po prvi put u ovoj doktorskoj disertaciji su uspostavljeni efikasni protokoli za regeneraciju biljaka kelerabe *in vitro* putem somatske embriogeneze, kao i *de novo* organogeneze iz intaktnih klijanaca.

### 5.1. Somatska embriogeneza

*In vitro* razviće biljaka zavisi od različitih faktora, kao što su vrsta biljke, genotip, starost i stadijum razvića eksplantata, fiziološko stanje majke biljke koja je izvor eksplantata. Takođe, veoma bitni faktori su sastav hranljive podloge i uslovi u kulturi, kao što su svetlost i temperatura. Interakcija između svih ovih faktora vodi ka indukciji i ekspresiji specifičnog puta dediferencijacije ćelija i razvića organa, odnosno biljaka (Gaj 2004).

Preduslov za upostavljanje uspešnog sistema za somatsku embriogenezu podrazumeva dobar izbor biljnog materijala, tj. da eksplantati budu izvor kompetentnih ćelija. Sa druge strane, određivanje fizičkih i hemijskih faktora koji indukuju njihov embriogeni put razvića je takođe izuzetno važno (Gaj 2004).

Somatska embriogeneza može biti indukovana iz različitih tipova eksplantata, kao što su klijanci i njihovi fragmenti: petiole, listovi, korenovi, kotiledoni i meristemi izdanaka, kao i semena i zigotski embrioni. Nezreli zigotski embrioni predstavljaju najčešće korišćen izvor embriogenih ćelija. Njihova upotreba je omogućila indukciju

somatske embriogeneze i kod onih vrsta biljaka kod kojih je tokom godina istraživanja nije bilo moguće dobiti (Raemakers i sar. 1995; Von Arnold i sar. 1996). U ovom istraživanju, nezreli zigotski embrioni kelerabe demonstrirali su visok potencijal za regeneraciju biljaka putem repetitivne embriogeneze bez posredne kalusne faze.

Različiti tipovi eksplantata korišćeni za indukciju SE pokazuju najveći odgovor pri određenoj starosti (Fiore i sar. 1997; Koh i Loh 2000). Što se tiče zigotskih embriona veći embriogeni potencijal je, najčešće, zabeležen kod mlađih zigotskih embriona (Garin i sar. 1998). Međutim, uočeni su i slučajevi kod kojih embriogeni potencijal raste sa starošću, odnosno zrelošću zigotskih embriona (Choi YE i sar. 1998; Gaj 2001). Kod *A. thaliana* je pokazano da je zrelost zigotskog embriona uticala i na tip somatske embriogeneze, odnosno zreliji zigotski embrioni su ulazili u direktnu SE, dok je kod mlađih najpre dolazilo do formiranja kalusa iz kojeg su se razvili somatski embrioni (Pillon i sar. 1996; Gaj 2001; Mordhorst i sar. 1998).

Stadijum razvića nezrelih zigotskih embriona kelerabe pokazao se kao veoma važan za embriogenu kompetenciju, kao što je pokazano i za druge pripadnike roda *Brassica* (Koh i Loh 2000; Gaj 2001, 2004; Burbulis i Kupriene 2005; Rai i sar. 2007). U našem radu, najviša frekvencija somatske embriogeneze zabeležena je kod zigotskih embriona u ranom kotiledonarnom stadijumu razvića, dok su eksplantati u stadijumu torpeda i u kasnom kotiledonarnom stadijumu dali manji odgovor. Razlika može biti rezultat toga što se eksplantati u različitim stadijumima razvića odlikuju drugačijim fiziološkim statusom (Rai i sar. 2007).

Auksini i citokinini predstavljaju esencijalne regulatore rastenja kod biljaka i uključeni su u regulaciju ćelijskih deoba i diferencijaciju. Eksperimentalni podaci prikupljeni za veliki broj biljnih vrsta u poslednje dve decenije upravo ukazuju na to da ovi biljni hormoni predstavljaju ključne faktore za sticanje embriogene kompetencije i da njihovo dodavanje u podlogu za gajenje indukuje somatsku embriogenezu *in vitro* (Von Arnold i sar. 2002; Jiménez 2005). Pretpostavlja se da je ova pojava povezana sa njihovom ulogom u regulaciji ćelijskog ciklusa i ćelijskoj deobi (Francis i Sorrell 2001; Fehér i sar. 2003; Gaj 2004).

Od auksina je najčešće korišćen 2,4-D (Raemakers i sar. 1995) koji se pokazao najefikasnijim kod brojnih biljnih vrsta (Pillon i sar. 1996; Choi i sar. 1998; Gaj 2001). Čak u 65% protokola ovaj auksin je korišćen sam ili u kombinaciji sa drugim regulatorima rastenja (Gaj 2004).

Međutim, 2,4-D je imao negativan efekat na somatsku embriogenezu kelerabe. Dodatak 2,4-D osnovnoj hranljivoj podlozi je doveo do smanjenja efikasnosti somatske embriogeneze kod nezrelih zigotskih embriona, a ovaj auksin nije ispoljio ni stimulatorni efekat na dalje razviće somatskih embriona. Naime, oba procesa su bila efikasnija na podlozi bez regulatora rastenja. Šta više, prisustvo 2,4-D u hranljivoj podlozi dovelo je do nepravilnog rastenja i deformacije eksplantata nevezano za njihov stadijum razvića, a stepen deformisanosti rastao je sa povećanjem koncentracije 2,4-D. Takođe, kompaktan kalus se mogao uočiti samo kod manjeg broja eksplantata gajenih na većim koncentracijama 2,4-D, a u ostalim slučajevima, somatski embrioni su formirani direktno na eksplantatu, bez posredne kalusne faze.

Pored toga što 2,4-D ima ulogu inicijatora embriogenog razvića u biljnim ćelijama gajenim *in vitro*, ovaj auksin takođe deluje kao jak stresor (Fehér i sar. 2003). Primena 2,4-D u podlozi za indukciju somatskih embriona može imati štetan efekat, kao što je razviće malformisanih embriona (Rodriguez i Wetzstein 1994; 1998). Smatra se da to može biti posledica narušavanja polarnog transporta endogenih auksina usled egzogene primene auksina (Choi i sar. 1997). Primena auksina takođe može dovesti do inhibicije razvića embriogenih masa u somatske embrione, tako što ili inhibira polaritet ćelije ili onemogućava stvaranje auksinskog gradijenta (Von Arnold 2002; Fehér i sar. 2003).

U nekim sistemima pokazano je da su umesto auksina citokinini efikasni u indukciji somatske embriogeneze (Carimi i sar. 1999; Sagare i sar. 2000; Chen i Chang 2001; Kim i sar. 2003). Međutim, ovaj sistem za indukciju somatske embriogeneze koji uključuje samo citokinine je redak. Pokazano je da je od ispitivanih protokola za indukciju somatske embriogeneze, manje od 14% koristilo neki iz ove grupe hormona (Gaj 2004). Od toga, BAP je najčešće korišćen, zatim kinetin, i na kraju zeatin i TDZ (Raemakers i sar. 1995). Međutim, u poslednje vreme se TDZ pokazao kao efikasan u

indukciji direktne SE visoke frekvencije i kod diferenciranih tkiva, kao što su hipokotili i kotiledoni (Zhang i sar. 2005).

Somatska embriogeneza na podlozi bez biljnih regulatora rastenja je retka pojava. Gaj i saradnici (2004) su pokazali da su regulatori rastenja korišćeni za indukciju somatske embriogeneze u 93% analiziranih protokola. Kod najvećeg broja vrsta kod kojih nije potreban dodatak regulatora rastenja za indukciju somatske embriogeneze, endogeni auksini i citokinini su bili ključni faktori u određivanju embriogenog odgovora (Fehér i sar. 2003; Gaj 2004; Jiménez 2005), verovatno zbog toga što, kao što je već pomenuto, imaju važnu ulogu u regulisanju ćelijskog ciklusa i ćelijske deobe.

Visok potencijal za somatsku embriogenezu kod kelerabe uočen je kod hipokotila iskljajalih nezrelih zigotskih eksplantata. To je u skladu sa rezultatima istraživanja kod mnogih drugih biljnih vrsta (Kim i sar. 2003; Burbulis i Kupriene 2005), što ukazuje na to da su mladi hipokotili povoljne mete za indukciju somatske embriogeneze. Konar i saradnici (1972) su ovaj potencijal pripisali epidermalnim ćelijama hipokotila koje su povratile meristemske karakteristike, tj kapacitet.

Prisustvo auksina je, u većini slučajeva, neophodno za indukciju sekundarne somatske embriogeneze. Kod nekih sistema potrebna je kombinacija auksina sa citokininima (Agarwal i sar. 2004) ili se sekundarna somatska embriogeneza javlja u odsustvu biljnih regulatora rastenja (Koh i Loh 2000). Kada je u pitanju keleraba, u ovom radu je pokazano da su se sekundarni embrioni spontano javljali na primarnim tokom gajenja na podlozi bez regulatora rastenja. Egzogeno primenjeni citokinini generalno nisu doveli do značajnog povećanja frekvencije sekundarne embriogeneze.

Većina vrsta pokazuje nižu frekvenciju indukcije primarne u odnosu na indukciju sekundarne embriogeneze (Raemakers et al. 1995; Vasic et al. 2001). Takođe, neke kulture imaju sposobnost da održe kompetenciju za sekundarnu embriogenezu dugi niz godina (Thorpe 2000; Martinelli i sar. 2001). Slični rezultati su dobijeni i u našim istraživanjima kelerabe, gde su nakon jedne godine repetitivne somatske embriogeneze na hranljivoj podlozi bez biljnih regulatora rastenja, kulture i dalje zadržale visok embriogeni potencijal. Najviši intenzitet sekundarne somatske

embriogeneze je zabeležen kod embriogenih linija koje su vodile poreklo od zigotskih eksplantata u ranom kotiledonarnom stadijumu. Ova vrednost je bila skoro trostruka u odnosu na onu dobijenu za primarnu somatsku embriogenezu iz istih eksplantata što sve zajedno pruža mogućnost za produkciju velikog broja embriona u relativno kratkom vremenskom periodu. Svi testirani sekundarni embrioni su isključili u biljčice od kojih se većina razvila u normalne diploidne biljke što ukazuje na to da su šanse za pojavu somaklonalnog variranja tokom ovog regenerativnog postupka veoma male. Na osnovu svega ovoga može se zaključiti da je po prvi put kod kelerabe uspostavljen veoma efikasan regenerativni sistem putem somatske embriogeneze.

Klasičan koncept somatske embriogeneze podrazumeva da somatski embrion potiče od jedne ćelije (Haccius 1978) što je pokazano kod različitih biljaka kao što je npr. šargarepa (Toonen i sar. 1994). Međutim, jednoćelijsko poreklo somatskih embriona nije pravilo i postoje primeri istovremene pojave jednoćelijskog i višećelijskog porekla u jednom regenerativnom sistemu (Chan i sar. 1998). Danas se smatra da su oni regenerativni sistemi koji mogu garantovati jednoćelijsko poreklo somatskih embriona veoma retki. Somatski embrioni koji se formiraju iz kalusa, odnosno putem indirektno SE imaju veću verovatnoću višećelijskog porekla, dok je u direktno SE veća verovatnoća da somatski embrioni nastaju od pojedinačne ćelije (Gaj 2004). U većini slučajeva gde biljni regulatori rastenja nisu korišćeni za embriogenu indukciju, somatski embrioni se formiraju direktno na površini eksplantata bez formiranog kalusa (Fehér i sar. 2003), kao što je pokazano i u slučaju kelerabe. U našim istraživanjima, histološka analiza je ukazala na to da su somatski embrioni formirani direktno iz površinskih ćelija, odnosno slojeva eksplantata, bez posredne kalusne faze.

Somatski embrioni se obično razvijaju u male biljke, slično klijancima, na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja. Međutim, u brojnim sistemima za indukciju SE, iako dolazi do formiranja velikog broja embriona, mnogi od njih ne uspevaju da se razviju u biljke. Najčešće se za razviće somatskih embriona u biljke u podlogu dodaje giberelna kiselina (Kim i sar. 1997; Yang i Choi 2000), glutamin ili hidrolizat kazeina (Von Arnold i sar. 2002). Takođe, u ove svrhe koriste se i indol-3-buterna kiselina, abscisinska kiselina ili citokinini (Ahmed i sar. 1996; Choi YE i sar. 1998; Sarasan i sar. 2001). U istraživanjima kelerabe 96% embriona se spontano razvilo u mlade biljčice, a



nakon jednog meseca aklimatizacije u staklenoj bašti stepen preživljavanja je iznosio 72,5%. Efikasna konverzija embriona u biljke predstavlja važan preduslov za primenu ovog protokola u biotehnološkim programima oplemenjivanja kelerabe.

Uspostavljeni sistem za regeneraciju kelerabe, kao jedan od model sistema u kojima dodatak biljnih regulatora rasta nije neophodan za indukciju somatske embriogeneze, može takođe da doprinese razjašnjenju ranih regulatornih događaja u razviću embriona.

### 5.2. *De novo* organogeneza

*De novo* organogeneza predstavlja najčešće korišćen put za regeneraciju biljaka kod mnogih vrsta iz roda *Brassica* (Cardoza i Stewart 2004). Takođe, pokazano je da se pripadnici roda *Brassica* karakterišu veoma visokom genotipskom specifičnošću za regeneraciju (Cardoza i Stewart 2004). Zato je za svaki genotip neophodno razviti odgovarajući protokol za regeneraciju.

U ovom radu predstavljen je efikasan protokol za *in vitro* organogenezu izdanaka kod dve sorte kelerabe – Bečka Plava (BP) i Bečka Bela (BB). Naša istraživanja su pokazala da je morfogenetski potencijal kelerabe bio varijabilan i da je zavisio od tkiva eksplantata i primenjenih regulatora rasteња kod obe sorte, što je prethodno pokazano za druge pripadnike roda *Brassica* (Ovesná i sar. 1993; Sparrow i sar. 2004; Akasaka-Kennedy i sar. 2005; Ghnaya i sar. 2008; Pavlović i sar. 2010). Svaki od primenjenih citokinina (*transZ*, *cisZ*, TDZ, BAP) je samostalno doveo do indukcije regeneracije izdanaka i kod hipokotila i kod klijanaca kelerabe, bez potrebe za egzogenom primenom auksina. Protokoli za regeneraciju koji ne obuhvataju auksine se smatraju pogodnijim, s obzirom na to da egzogena primena ovih regulatora rasteња u kulturi biljnog tkiva može dovesti do somaklonalnih varijacija (Lo Schiavo i sar. 1989; Neelakandan i Wang 2012).

*De novo* regeneracija izdanaka kelerabe na hranljivim podlogama sa citokininima odvijala se putem procesa indirektno organogeneze koji je podrazumevao kalusnu fazu što je potvrdila i histološka analiza klijanaca gajenih na podlogama sa CK.

Formiranje kalusa uočeno je kod svih tretmana, a sposobnost regeneracije izdanaka zavisila je, između ostalog, od tipa eksplantata.

### 5.2.1. Efekat tipa eksplantata na efikasnost regeneracije izdanaka

Postoje brojni literaturni podaci o uspešnim regeneracijama biljaka kako iz kotiledona (Teo i sar. 1997; Mollika i sar. 2011; Ravanfar i sar. 2011; 2014) tako i iz korena (Wong i Loh 1988; Sharma i Thorpe 1989) kod različitih vrsta roda *Brassica*. U našem istraživanju, koren i kotiledon se nisu pokazali kao pogodan eksplantatski materijal za *in vitro* regeneraciju kelerabe, dajući niske vrednosti kako za frekvenciju organogeneze tako i za prosečan broj regenerisanih izdanaka. Imajući u vidu da su za indukciju regeneracije kod drugih vrsta *Brassica* korišćeni auksini, moguće je da je prisustvo ovih hormona u podlozi neophodno u slučaju upotrebe kotiledona ili korena kao primarnih eksplantata i u slučaju kelerabe. Odsecci kotiledona su se pokazali efikasnim za regeneraciju izdanaka kod ukrasnog kelja (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), ali su bili manje produktivni u odnosu na hipokotil čak i na podlozi sa auksinom (Dai i sar. 2009). Takođe, kod portugalskog kelja (*Brassica oleracea* L. var. *tranchuda*) hipokotili su bili uspešniji u regeneraciji izdanaka u odnosu na kotiledone (Msikita i Skirvin 1989). Nasuprot ovome, kod uljane repice (*Brassica napus* L.), zabeležena je veća efikasnost regeneracije kod kotiledona u odnosu na hipokotile, dok su eksplantati korena i u ovom slučaju ispoljili mali regenerativni potencijal (Kamal i sar. 2007).

Odsecci hipokotila kelerabe su se pokazali uspešnijim eksplantatima u regeneraciji izdanaka u odnosu na odsečke korenova i kotiledona, što je u skladu sa prethodnim opažanjima da su hipokotili najpogodniji eksplantati i za regeneraciju i za genetičku transformaciju biljaka kod mnogih vrsta iz roda *Brassica* (Cardoza i Stewart 2004). Sa druge strane, u poređenju sa intaktnim klijanacima odlikovali su se nižom frekvencijom regeneracije. Upotreba intaktnih klijanaca kelerabe bila je veoma uspešna, pri čemu je na tretmanima sa 2 mg L<sup>-1</sup> TDZ odnosno 5 mg L<sup>-1</sup> BAP dobijena skoro deset puta veća efikasnost regeneracije kod obe sorte u odnosu na odsečke hipokotila. Takođe, uspešna *in vitro* morfogeneza iz intaktnih klijanaca je opisana i kod *Lotus*

*corniculatus* L. (Nikolić i sar. 2006). Izdanci dobijeni regeneracijom iz klijanaca kelerabe izgledali su vijabilnije od onih dobijenih iz eksplantata hipokotila.

Interesantno, prosečan broj regenerisanih izdanaka po eksplantatu je bio viši kod eksplantata hipokotila u odnosu na klijance. Moguće je da je na efikasnost za regeneraciju izdanaka iz hipokotila uticala starost tkiva. U većini istraživanja pokazano je da eksplantati poreklom iz nekoliko dana starih klijanaca daju optimalne frekvencije regeneracije. Tako, kod *B. rapa* ssp. *oleifera* je pokazano da su tri dana stari klijanci dali bolji materijal za regeneraciju nego oni stari četiri dana (Burnett i sar. 1994). Kod *B. napus* eksplantati iz četiri dana starih klijanaca su imali frekvenciju regeneracije od 90% (Ono i sar. 1994), a kod *B. rapa* najbolju regeneraciju su dali eksplantati iz biljnog materijala starog 3 dana (Teo i sar. 1997). I kod *B. juncea*, optimalna regeneracija izdanaka je dobijena upotrebom eksplantata iz 3-5 dana starih klijanaca (Sharma i sar. 1990). Dodatno, pokazano je da je optimalna starost hipokotila za produkciju izdanaka procesom *de novo* organogeneze do sedam dana (Fuller i sar. 1994; Kamal i sar. 2007; Pavlović i sar. 2010; Ravanfar i sar. 2014). U ovom radu su za eksperimente korišćeni odsecci hipokotila klijanaca kelerabe starih dve nedelje, pošto klijanci kelerabe mlađi od dve nedelje nisu bili dovoljno razvijeni. Upotreba eksplantata izolovanih iz dve nedelje starih klijanaca u regeneraciji izdanaka zabeležena je takođe kod kupusa (Jin i sar. 2000).

### 5.2.2. Efekat egzogeno primenjenih citokinina na regeneraciju izdanaka

Kod mnogih biljnih vrsta, uključujući i pripadnike roda *Brassica*, BAP i TDZ su najefikasniji kada je u pitanju *de novo* organogeneza izdanaka, pa su iz tog razloga i najčešće korišćeni citokinini (Glendening i Sjolund 1988; Khan i sar. 2003; Ghnaya i sar. 2008; Abassi i sar. 2011). TDZ, kao i drugi sintetički citokinini, je izgleda manje osetljiv na enzimsku degradaciju *in vivo* u poređenju sa prirodnim citokininima, tako da i pri niskim koncentracijama može indukovati veći odgovor biljnog tkiva. Međutim, ovaj regulator rastenja takođe može izazvati neke neželjene posledice, kao što su inhibicija izduživanja izdanaka, srastanje izdanaka i hiperhidracija (Magyar-Tábori i sar. 2010). U ovom istraživanju zabeležena je visoka efikasnost oba ova hormona u indukciji organogeneze izdanaka kelerabe bez pojave bilo kakvih neželjenih efekata.

Takođe, pokazano je da je među egzogeno primenjenim citokininima *transZ* bio najuspešniji u pogledu broja *de novo* indukovanih izdanaka iz hipokotila kod sorte BP. Ovaj citokinin je doprineo i visokoj frekvenciji regeneracije izdanaka, slično onoj dobijenoj sa BAP i TDZ kod BB hipokotila, kao i kod klijanaca obe sorte. Ovi podaci nisu u saglasnosti sa prethodno objavljenim zapažanjima kod različitih biljnih vrsta gde se *transZ* pokazao kao najmanje uspešan u indukciji *de novo* organogeneze izdanaka (Bretagne i sar. 1994; Pellegrineschi 1997; Ahmadabadi i Bock 2010; Verma i sar. 2011). Ipak, postoje i literaturni podaci gde je *transZ* bio efektivniji u stimulanju regeneracije izdanaka od drugih citokinina (Coleman i Ernst 1989; Souza i sar. 2003), ili sa sličnim efektom kao BAP (Suri i sar. 2005).

Regeneracija izdanaka kelerabe, kako iz hipokotila tako i iz intaktnih klijanaca, je ostvarena i na hranljivoj podlozi sa *cisZ*. Interesantno je da se dugo vremena smatralo da je fiziološka aktivnost zeatina ograničena samo na *transZ*, dok se za *cisZ* verovalo da je neaktivna ili slabo fiziološki aktivna forma citokinina. Ovi zaključci su bili izvedeni na osnovu ranijih radova koji su opisivali slabu biološku aktivnost *cisZ* u nekim citokininskim biološkim testovima (Schmitz i sar. 1972; Kamínek i sar. 1979). Upravo zato su brojna istraživanja biosinteze i metabolizma citokinina uglavnom bila fokusirana na *transZ*, iako su *cisZ* i njegovi derivati izolovani iz više vrsta, uključujući krompir (Nicander i sar. 1995), pirinač (Izumi sar. 1988; Takagi i sar. 1989), hmelj (Watanabe i sar. 1981), pšenicu (Parker i sar. 1989), ovas (Parker i sar. 1989) i leblebije (Emery i sar. 1998). Međutim, ova tema vezana za aktivnost *cisZ* odnosno *transZ* je veoma aktuelna poslednjih godina i predstavlja predmet brojnih diskusija. Skorije analize su pokazale da *cis* izomeri mogu imati ulogu dominantnih citokinina u određenim stadijumima rastenja i razvića biljaka (Emery i sar. 1998; 2000; Gajdošová i sar. 2011; Stirk i sar. 2012). Takođe, geni koji kodiraju enzime *O*-glukoziltransferaze, specifične za *O*-glukozilaciju *cisZ* identifikovani su kod kukuruza (Martin i sar. 2001; Veach i sar. 2003). Ova otkrića ukazuju na to da *cis*-izomeri zeatina mogu imati jedinstvene fiziološke funkcije u rastenju i razviću biljaka. U ovom radu je pokazano da je *cisZ* biološki aktivan u procesu regeneracije izdanaka iz eksplantata hipokotila, kao i drugi primenjeni citokinini. Sa druge strane, *cisZ* se pokazao mnogo manje efikasan u odnosu na njegov *trans* izomer u regeneraciji izdanaka iz intaktnih klijanaca kelerabe.

### 5.2.3. Efekat citokininskih pretretmana na umnožavanje izdanaka dobijenih *de novo* organogenezom

Izdanci regenerisani na odsečcima hipokotila ili intaktnim klijancima su odvojeni od primarnih eksplantata i dalje gajeni na hranljivoj podlozi koja je sadržala 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP. Smatra se da su podloge sa BAP najbolje podloge za umnožavanje izdanaka kod brojnih biljnih vrsta (Sharma i Thorpe 1990; Ružić i Vujović 2008; Moura i sar. 2009; Yunus i sar. 2012). Gajenje regenerisanih izdanaka kelerabe na ovoj hranljivoj podlozi pružilo je dodatnu mogućnost za izučavanje razlika u potencijalu za umnožavanje između izdanaka regenerisanih iz eksplantata hipokotila i klijanaca, kao i između pretretmana različitim citokininima. Efekat citokininskog pretretmana na umnožavanje izdanaka regenerisanih na klijancima se razlikovao između dve ispitivane sorte. Kod BP efekat pretretmana bio je uočljiv, dok kod BB efekat pretretmana nije detektovan. Razlika između BP i BB genotipova u smislu trajanja efekata citokinina može biti posledica razlike u njihovom metabolizmu. Moguće je da su kod BB akumulirane veće količine citokinina, pa je premašena gornja granica osetljivosti tkiva na citokinine, zbog čega je izostala očekivana stimulacija umnožavanja izdanaka od strane ovih regulatora rastanja.

### 5.2.4. Ožiljavanje i aklimatizacija umnoženih izdanaka regenerisanih iz klijanaca

Prisustvo IBA u koncentraciji od 4 mg L<sup>-1</sup> u hranljivoj podlozi za ožiljavanje je dovelo do povećanja frekvencije rizogeneze kao i broja korenova formiranih po izdanku kod obe sorte kelerabe u odnosu na 2 mg L<sup>-1</sup> IBA. Prosečna dužina korena je bila povećana, dok su Pavlović i saradnici (2010) zabeležili da su i frekvencija ožiljavanja i prosečna dužina korena bili umanjeni prilikom dodavanja 4 mg L<sup>-1</sup> u odnosu na 2 mg L<sup>-1</sup> IBA kod različitih varijeteta *Brassica oleracea* L. Abbasi i saradnici (2011) su takođe pokazali da su najviše vrednosti za frekvenciju ožiljavanja, broj korenova po izdanku, kao i dužinu korena dobijene na podlozi sa 3 mg L<sup>-1</sup> IBA, dok su koncentracije više od ovih (4 mg L<sup>-1</sup>) imale inhibitorni efekat na parametre ožiljavanja kod *B. rapa* L. var. *turnip*. Rezultati, dobijeni u ovom istraživanju, ukazuju na to je keleraba možda manje osetljiva prema IBA nego druge vrste roda *Brassica* kod kojih je proučavana rizogeneza. Zbog toga je potrebna primena koncentracije IBA od 4 mg L<sup>-1</sup> kako bi se

dostigao maksimalni odgovor kod kelerabe. Dobra ožiljenost regenerisanih biljaka doprinela je njihovoj daljoj uspešnoj aklimatizaciji. Sve aklimatizovane biljke kelerabe su nastavile normalno da se razvijaju, cvetaju i formiraju mahune, pri čemu ni kod jedne biljke nije došlo do promene ploidnosti. Sve ovo ukazuje na uspešnost i efikasnost protokola za regeneraciju kelerabe putem *de novo* organogeneze razvijenog u okviru ove doktorske teze.

### **5.3. Endogeni nivo citokinina i IAA**

Sastav hranljive podloge za regeneraciju, odnosno primenjeni citokinini imali su uticaj na nivo endogenih citokinina, kao i IAA, i kod hipokotila sa regenerisanim izdancima (HRI) i kod klijanaca sa regenerisanim izdancima (KRI). Smatra se da su ove promene u nivou endogenih biljnih hormona najverovatnije doprinele regenerativnom potencijalu ovih eksplantata.

#### **5.3.1. Nivo endogenih citokinina i IAA u eksplantatima sa regenerisanim izdancima gajenim na različitim hranljivim podlogama za regeneraciju**

U cilju ispitivanja uloge citokinina u regeneraciji izdanaka kelerabe *in vitro*, u ovom istraživanju je po prvi put izmeren sadržaj endogenih citokinina i napravljen potpuni citokininski profil odsečaka hipokotila sa regenerisanim izdancima i intaktnih klijanaca sa regenerisanim izdancima kelerabe.

Dodavanje sintetičkih citokinina, kao što su BAP i TDZ, u hranljivu podlogu za regeneraciju izdanaka izazvalo je ili nikakvo ili veoma malo povećanje endogenog nivoa citokinina i kod HRI i kod KRI, u poređenju sa kontrolom. Međutim, kada su u podlogu za regeneraciju dodati neki od prirodnih citokinina *trans-*, odnosno *cisZ*, uočen je značajan porast u nivou endogenih citokinina. Naročito je došlo do povećanja sadržaja kod istog tipa citokinina, *trans-* ili *cisZ*, koji je i primenjen u hranljivoj podlozi. Ovi podaci ukazuju na to da je porast u nivou citokinina prvenstveno bila posledica usvajanja citokinina iz hranljive podloge. Slično ovome, u ranijoj literaturi postoje podaci da endogeni nivoi određenih citokinina rastu nakon njihovog egzogenog

dodavanja u podlogu za gajenje (Klemš i sar. 2011; Montalbán i sar. 2013; Aremu i sar. 2014a). Izrazitiji porast endogenih citokinina u HRI gajenih na podlozi koja je sadržavala *cisZ* odnosno *transZ* u odnosu na KRI gajenih na istim hranljivim podlogama, sugerirše da je usvajanje egzogenih citokinina možda efikasnije za segmente hipokotila nego za klijance.

Dodatak *transZ* u hranljivu podlogu je takođe doveo do značajnog povećanja endogenih nivoa *cisZ*-tipa citokinina, dok je egzogeno dodat *cisZ* doveo do porasta endogenih nivoa *transZ*-tipa citokinina. Istovremeno, u oba slučaja je došlo i do značajnog povećanja nivoa DHZ-tipa citokinina. Ovi efekti su ponovo naročito bili izraženi u HRI kod obe sorte. Moguće objašnjenje dobijenih rezultata jeste da se porast endogenog nivoa *cisZ* nakon usvajanja iz podloge u koju je dodat *transZ* i obrnuto može pripisati usvajanju jednog od izomera iz hranljive podloge, koji se zatim prevodi u drugi, verovatno preko procesa *cis-trans* izomerizacije. Naime, interkonverzija između *cis*- i *transZ* delovanjem zeatin-*cis-trans* izomeraze je predložena kod *Phaseolus vulgaris* (Bassil i sar. 1993) i *A. thaliana* (Kasahara i sar. 2004), iako su skorija istraživanja izazvala sumnju vezanu uopšte za važnost ovog procesa u biljkama *in vivo* (Gajdošová i sar. 2011). Montalbán i saradnici (2013) su takođe pokazali da se tokom regeneracije izdanaka iz vegetativnih pupoljaka kod kalifornijskog bora (*Pinus radiata*) endogeni nivo *cisZ* povećava nakon gajenja na hranljivoj podlozi obogaćenoj sa *transZ*, i obrnuto.

Prisustvo egzogenih citokinina u hranljivim podlogama generalno nije doprinelo povećanju endogenog nivoa iP-tipa citokinina ni u jednom od ispitivanih tkiva kod obe sorte kelerabe. Smatra se da ovaj tip citokinina prvenstveno ima ulogu prekursora za biosintezu odgovarajućih izomera zeatina (Takei i sar. 2004b). Slične rezultate su objavili i Montalbán i sar. (2013). Kod sorte Bečka plava, izlaganje citokininima iz hranljive podloge dovelo je čak i do opadanja endogenog nivoa iP-tipa citokinina u poređenju sa kontrolom, i kod HRI i kod KRI. Ovakvi rezultati mogu biti pokazatelj regulacije koja se odvija putem negativne povratne sprege. Prethodna istraživanja su pokazala da su nivoi endogenih citokinina u biljkama podređeni takvoj kontroli putem negativne povratne sprege, ili putem smanjenja biosinteze (Miyawaki i sar. 2004) ili povećanjem katabolizma (Motyka i sar. 2003; Brugière i sar. 2003).

Nakon usvajanja iz hranljive podloge, citokinini bi u biljkama mogli postojati ili kao bioaktivni citokinini ili bi moglo doći do njihove konjugacije pri čemu nastaju citokininski *O*- i *N*-glukozidi, sudeći po porastu ovih klasa citokinina nakon gajenja na *transZ* ili *cisZ* u poređenju sa kontrolom, naročito u HRI kod obe sorte. Akumulacija citokininskih *O*- i *N*-glukozida je prethodno zabeležena u biljnim tkivima izloženim pojačanom usvajanju (Klemš i sar. 2011; Montalbán i sar. 2013) ili izmenjenoj hormonskoj homeostazi (Raspor i sar. 2012) i predstavlja posledicu metaboličke glukozilacije. *O*-glukozidi nastaju vezivanjem glukoze na neki od atoma kiseonika bočnog lanca slobodnog *transZ*, *cisZ*, DHZ, njihovih ribozida (Bajguz i Piotrowska, 2009; Stirk i sar. 2012). Uloga *O*-glukozilacije je privremena deaktivacija, skladištenje i zaštita od mehanizama katabolizma (Veitch i sar. 2003; Stirk i sar. 2012). Sa druge strane, *N*-glukozidi nastaju glukozilacijom atoma azota adeninskog prstena citokininskih slobodnih baza, njihovih ribozida ili ribotida, a biološka uloga *N*-glukozilacije još uvek nije razjašnjena (Bajguz i Piotrowska 2009). Kod KRI, najviši nivo ukupnih citokinina zabeležen je na podlozi sa *cisZ*, što se može smatrati posledicom ekstremno visokog nivoa upravo neaktivnih formi citokinina, *N*-glukozida.

Sadržaj endogenih citokinina i IAA, kao i odnos IAA i bioaktivnih citokinina su ukazali na to da postoji jasna razlika između HRI i KRI po pitanju endogenih nivoa ovih biljnih hormona kod kelerabe. HRI su generalno sadržali veću količinu citokinina u odnosu na KRI, dok su KRI sadržali više IAA i za njih je dobijen i viši odnos IAA i bioaktivnih citokinina. Stirk i saradnici (2008) su pokazali da stadijum razvića biljaka ima uticaja na nivo endogenih citokinina kao i na njihove metabolite. To može biti razlog primećenih razlika između HRI i KRI u našem slučaju, s obzirom na to da su hipokotili predstavljali starije tkivo u odnosu na tkivo klijanaca.

Dodavanje citokinina u hranljivu podlogu za regeneraciju dovelo je do porasta u endogenim nivoima IAA i u HRI i u KRI kod obe sorte, u poređenju sa eksplantatima gajenim na kontrolnoj podlozi koja nije sadržala biljne regulatore rastenja. Zabeleženi porast endogene IAA je doveo i do povećanja odnosa IAA i bioaktivnih citokinina u većini KRI gajenih na podlogama sa citokininima i kod BP i kod BB.

Od kada su otkriveni, pokazano je da citokinini i auksini međusobno intereaguju tokom nekoliko fizioloških i razvojnih procesa biljaka uključujući apikalnu dominaciju,



regulaciju ćelijskog ciklusa, grananje korena, regulaciju senescencije i razviće vaskularnih elemenata (Coenen i Lomax 1997; Swarup i sar. 2002). Pri tome, može se smatrati da je odnos citokinina i auksina prilično međusobno zavisian. U većini slučajeva promena endogenog nivoa jednog biljnog hormona utiče na promenu endogenog nivoa drugog (Coenen i Lomax 1997). Dobijeni rezultati su u skladu sa već poznatom činjenicom da citokinini utiču na endogeni nivo auksina u biljkama, pri čemu je taj uticaj prilično promenljiv (Eklöf i sar. 1997).

Postoje različiti literaturni podaci o citokininima kao pozitivnim regulatorima biosinteze auksina (Jones i sar. 2010), gde povećanje količine citokinina utiče na povećanje nivoa auksina i obrnuto. Tako je pokazano da kod *ipt* mutanata *Nicotiana glutinosa* povećanje nivoa citokinina uzrokuje povećanje količine slobodne IAA (Binns i sar. 1987). Egzogeni citokinini utiče na porast nivoa IAA u korenu kukuruza i graška (Bourquin i Pilet 1990; Bertell i Eliasson 1992). Povećana stopa biosinteze IAA je zabeležena i u apeksima izdanaka, mladim listovima i korenovima deset dana starih klijanaca *A. thaliana*, gajenih u tečnoj podlozi obogaćenoj sa BAP, *transZ* ili *cisZ* (Jones i sar. 2010). Pokazano je takođe da su egzogeni citokinini indukovali lokalnu biosintezu kao i polarni transport auksina tokom regeneracije izdanaka *A. thaliana* (Cheng i sar. 2013). Dodatno, postoje podaci da povećana aktivnost CKX enzima kod *A. thaliana* snižava nivo endogenih citokinina što dalje utiče na smanjenje količine endogenih auksina (Werner i sar. 2001; Jones i sar. 2010).

Ipak, postoji i nekoliko istraživanja koja ukazuju na suprotan efekat, a to je da citokinini negativno utiču na nivo auksina. Pokazano je da kod *ipt* mutanata duvana i *A. thaliana* povišen nivo citokinina utiče na smanjenje količine IAA (Eklöf i sar. 1997; Nordström i sar. 2004). Negativan uticaj citokinina na nivo auksina potvrđen je i kod *pls* mutanata *A. thaliana* (Liu i sar. 2010). Takođe, potvrđeno je da je regulacija biosinteze citokinina posredstvom auksina brza i direktna, dok je regulacija količine IAA posredstvom citokinina spora i indirektna (Nordström i sar. 2004).

Iz navedenih primera istraživanja složenog odnosa ove dve grupe hormona se može zaključiti da postoji mogućnost da je porast endogenog sadržaja IAA kod kelerabe koja je bila izložena tretmanu egzogenim citokininima upravo posledica biosinteze auksina indukovane citokininima.

### 5.3.2. Endogeni sadržaj citokinina i IAA kao mogući faktor koji utiče na efikasnost regeneracije

Nivo endogenih hormona ili njihov odnos može uticati na sposobnost *in vitro* regeneracije iz različitih eksplantata biljaka (Bouza i sar. 1993; Centeno i sar. 1996; Valdés i sar. 2001; Moncaleán i sar. 2003; Klemš i sar. 2011; Cuesta i sar. 2012; Montalbán i sar. 2013; Aremu i sar. 2014a; 2014b). Pored toga, citokini dodati u hranljivu podlogu mogu interagovati sa endogenim hormonima, menjajući razviće biljaka *in vitro* (Parker i sar. 1986; Valdés i sar. 2001; Moncaleán i sar. 2003; Klemš i sar. 2011).

Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su pokazali da su eksplantati kelerabe sposobni da formiraju kalus na hranljivim podlogama u koju su dodati samo citokinini, bez potrebe za egzogenim auksinima. Nasuprot ovome, standardni protokoli za *in vitro* regeneraciju kod najvećeg broja biljnih vrsta uključuju seriju od dva tipa hranljivih podloga od kojih prva sadrži auksine u cilju indukcije kalusa (CIM), dok druga sadrži citokinine koji su namenjeni za regeneraciju izdanaka (SIM) (Duclercq i sar. 2011; Motte i sar. 2014). Na molekularnom nivou je pokazano da u toku *de novo* organogeneze izdanaka dolazi do određenih promena u ekspresiji gena uključenih u auksinske i citokininske signalne puteve, kao i odgovarajućih transkripcionih faktora (Che i sar. 2006; 2007). Na početku, egzogeni auksin posreduje procese kao što su sticanje kompetencije za formiranje organa, dediferencijaciju ćelija, formiranje kalusa i u njemu specifičnih začetaka organa. Zatim, egzogeni citokinin iz hranljive podloge na koju se eksplantati dalje prenose, posreduje određivanje razvojnog puta od primordije organa do izdanka (Motte i sar. 2014).

Endogeni nivo auksina u tkivu eksplantata ima važan uticaj na sposobnost regeneracije. Kod mutanata *A. thaliana* sa visokom ekspresijom gena uključenih u biosintezu auksina pokazano je da postoji visok regenerativni kapacitet i u protokolima koji isključuju prvi korak inkubacije na podlozi sa auksinom (Zhao i sar. 2013). Međutim kod krompira, koji ima prirodno visok nivo endogenih auksina, do formiranja kalusa dolazi samo primenom standardnog protokola za regeneraciju i čak zahtevaju primenu antiauksinskih jedinjenja (Pal i sar. 2012).

U ovom radu pokazano je da su endogeni nivoi IAA značajno povišeni u eksplantatima hipokotila i klijancima kelerabe gajenih na podlogama u koje su dodati citokinini. Smatra se da su upravo ti povišeni nivoi auksina možda mogli biti dovoljni da indukuju prvu fazu organogeneze u ovim eksplantatima bez potrebe za dodatnim auksinom u hranljivim podlogama. Pretpostavlja se da su fitohormonski signalni putevi koji se odvijaju u biljakama u potpunosti zavisni od koncentracije endogenih hormona prisutnih u biljnim tkivima, što ne mora nužno da odražava sastav biljnih regulatora rastenja prisutnih u podlozi za regeneraciju (Gordon i sar. 2007).

U ovom istraživanju, najbolji rezultati za frekvenciju regeneracije kod obe sorte dobijeni su kod klijanaca gajenih na podlogama sa BAP, TDZ ili *transZ*. Interesantno, kod ovih klijanaca je i odnos IAA i bioaktivnih citokinina dostigao najviše vrednosti na ovim tretmanima. Prema dobijenim rezultatima, izgleda da su i efikasnost regeneracije izdanaka i vijabilnost regenerisanih izdanaka kelerabe u korelaciji upravo sa visokim odnosom endogene IAA i bioaktivnih citokinina. Prema tome, raspoloživost endogenog auksina može predstavljati važan faktor za početne faze u organogenezi izdanaka kod kelerabe, pre nego visok sadržaj citokinina koji je neophodan za kasnije formiranje primordija izdanaka.

Eksplantati hipokotila, bez obzira na nisku frekvenciju regeneracije, ispoljili su više vrednosti za prosečan broj regenerisanih izdanaka u odnosu na klijance kao eksplantate. Takođe, kod hipokotila je zabeležen i značajno niži odnos IAA i bioaktivnih citokinina usled višeg sadržaja citokinina kao i zbog nižeg IAA sadržaja. Okubo i saradnici (1991) su pokazali da kada je najniži odsečak hipokotila zevalice (*Antirrhinum majus* L.) korišćen kao eksplantat, ispoljio je veću sposobnost regeneracije izdanaka u odnosu na bilo koje druge odsečke nakon gajenja na podlozi sa BAP. Hemijske analize su pokazale da je ovaj segment takođe imao najviši sadržaj endogenih citokinina i najniži nivo IAA, ukazujući na ulogu ovih fitohormona u procesu regeneracije izdanaka. Poznato je da na morfogenezu izdanaka utiče ravnoteža između citokinina i auksina, koji su ili egzogeno dodati u hranljivu podlogu (Skoog i Miller 1957; Kohlenbach 1977) ili njihovom interakcijom u biljnim tkivima (Cheng i sar. 2013). Pretpostavlja se da visoki odnos auksina prema citokininima favorizuje formiranje korena, dok bi niži odnos trebalo da favorizuje regeneraciju izdanaka (Skoog

i Miller 1957). Stoga, hipokotili možda imaju veći potencijal za kasnije faze regeneracije izdanaka u odnosu na druge biljne delove, zahvaljujući različitom sastavu endogenih hormona. Ovo bi moglo predstavljati razlog zašto su eksplantati hipokotila proizveli veći prosečan broj izdanaka nego intaktni klijanci, iako je celokupna regeneracija iz klijanaca bila uspešnija.

Lokalne promene u koncentraciji biljnih hormona, uključujući uspostavljanje lokalnih gradijenata, aktiviraju razvojne procese vezane za organogenezu (Benková i sar. 2003; Pernisová i sar. 2009; Cheng i sar. 2013). Dalje, s obzirom na to da lokalne promene u sadržaju auksina vezane za organogenezu zavise od citokinina i obrnuto (Pernisová i sar. 2009; Cheng i sar. 2013), one mogu zavistiti od fitohormonskih signalnih puteva koji se odvijaju unutar intaktnih biljaka. Ovo može biti razlog zbog kojeg intaktni klijanci kelerabe podležu efikasnijoj regeneraciji izdanaka u odnosu na eksplantate koji su dobijeni iz izolovanih tkiva, kao što su hipokotili, kotiledoni ili koren, kod kojih izostaju fitohemijske interakcije sa drugim delovima biljke. Na taj način izdanci kelerabe regenerisani iz hipokotila se nisu pokazali viljabilni tokom eksperimenata umnožavanja izdanaka i na kraju su postali nekrotični. Nasuprot tome, izdanci dobijeni regeneracijom iz klijanaca su se uspešno umnožili i razvili u biljčice koje su se uspešno ožilile.

### **5.4. Ekspresija gena uključenih u kontrolu ćelijskog ciklusa tokom *de novo* organogeneze izdanaka**

Ciklus ćelijske deobe kod biljaka kontrolisan je ciklinima i kinazama zavisnim od ciklina (Berckmans i De Veylder 2009; Dong i sar. 2011). Kinaze zavisne od ciklina imaju centralnu ulogu u kontroli toka ćelijskog ciklusa, pri čemu je njihova aktivacija regulisana vezivanjem za odgovarajući ciklin u različitim kontrolnim tačkama (Dewitte i Murray 2003; Nieuwland i sar. 2009). Aktivnost ovih kompleksa je strogo kontrolisana tokom ćelijskog ciklusa i razvića organa, a dati kompleksi takođe mogu biti uključeni u regulaciju signalne transdukcije i procesa diferencijacije (Barroco i sar. 2003; Montero-Cortés i sar. 2010).

Pokazano je da ekspresiju određenih tipova ciklina, kao što je tip D, različito kontrolišu saharoza i biljni hormoni, kao što su citokinini i brasinosteroidi (Riou-Khamlichi i sar. 2000; Liu i sar. 2012; Rosa i sar. 2013). U našem radu praćen je uticaj različitih citokinina na nivoe ekspresije tri gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa, *CDKB2;1*, *CYCB2;4* i *CYCH;1*, u određenim vremenskim periodima (nakon 7, 10, 14, 21, 28 i 35 dana) tokom *in vitro* procesa organogeneze iz kljanaca BP kelerabe.

Kinaze zavisne od ciklina tipa B predstavljaju familiju mitotičkih CDKs koje su karakteristične samo za biljni svet, i ona obuhvata dve grupe kinaza CDKB1 i CDKB2. Pokazano je da je ekspresija ovih kinaza fazno specifična tokom ćelijskog ciklusa, pri čemu se CDKB1 eksprimira tokom prelaza S/rana M faza dok se CDKB2, uključujući i CDKB2;1, eksprimira u više ograničenom periodu tokom G2/M faza (Fobert i sar. 1996; Magyar i sar. 1997; Umeda i sar. 1999).

Lee i saradnici (2003) su koristeći *in vitro* proteinski test ("pull-down assay") prvi pokazali da se CDKB2;1 izolovana iz pirinča vezuje za B2 tip ciklina, CYCB2;1 i CYCB2;2, ali ne i za CYCA1;1. I jedan i drugi ciklin su ispoljili ili veoma mali afinitet ili potpuno odsustvo afiniteta za vezivanje CDKA;1 i CDKA;2. Ovi rezultati su ukazali na to da je interakcija CDKB2;1 i CYCB specifična. Takođe, proteinski kompleksi CDKB2;1/CYCB2;1 (ili CYCB2;2) su ispoljavali enzimsku aktivnost, ukazujući na funkcionalnost kompleksa kao i na to da kinazna aktivnost CDKB2;1 zavisi od interakcije sa CYCB2;1 ili CYCB2;2. I druga istraživanja kod *A. thaliana* pokazala su da se ciklini B tipa isključivo vezuju za CDK tipa B (Van Leene i sar. 2010).

U našem istraživanju dobijeni rezultati pokazuju da je promena aktivnosti analiziranih gena u korelaciji sa određenim fazama *de novo* organogeneze. Dobijeni su slični obrasci ekspresije gena *CDKB2;1* i *CYCB2;4* tokom 6 diskretnih tačaka kako u kontrolnom tkivu tako i kod svih citokininskih tretmana. To može značiti da je u procesu *de novo* organogeneze kelerabe tokom ćelijskih ciklusa došlo do interakcije i stvaranja kompleksa između CDKB2;1 i CYCB2;4. Ova pretpostavka je u skladu sa prethodnim istraživanjima specifičnosti vezivanja B2 tipa ciklina i kinaza zavisnih od ciklina tokom ćelijskog ciklusa kod drugih biljnih vrsta (Lee i sar. 2003; Van Leene i sar. 2010). Veliki relativni porast ekspresije *CDKB2;1* i *CYCB2;4* gena pod uticajem citokinina zabeležen je sedmog dana gajenja, pri čemu je uočeno povećanje relativnog

sadržaja transkripata 3 do 4 puta u odnosu na netretiranu kontrolu. U datom momentu na svim tretmanima kao i na kontrolnom bazalnom medijumu formirani su klijanci na stadijumu dva kotiledona. Interesantno je da je sa pojavom prvog kalusa nivo ekspresije oba gena bio sličan ili niži u odnosu na kontrolu za svaki od primenjenih citokinina, da bi opet došlo do povećanja aktivnosti u odnosu na kontrolu u momentu pojave regenerisanih izdanaka i dalje sa njihovim razvićem. Na različitim citokininskim tretmanima, regenerisani izdanci su se javljali različitom dinamikom koju je pratila i ekspresija analiziranih gena. Ovakvi rezultati ukazuju na postojanje složenog obrasca ponašanja ćelija u okviru meristema izdanka tokom procesa organogeneze.

Složenost procesa formiranja organa naglašava potrebu za preciznim balansiranjem ćelijskih deoba i diferencijacije u različitim delovima meristema kako bi se održala struktura i funkcija ovog tkiva. U tom smislu, veoma je važno da se signali meristemskih regulatora tačno protumače od strane mašinerije koja reguliše ćelijski ciklus. Koordinisane ćelijske deobe predstavljaju preduslov za formiranje organizovanih višćelijskih tkiva, međutim još uvek nije utvrđeno u kolikoj meri ćelijske deobe aktivno doprinose oblikovanju jednog organizma (Fleming 2006; Inzé i De Veylder 2006).

Postoje dve teorije koje opisuju moguće principe koji leže u osnovi rasteanja i razvića biljaka. Teorija ćelije podržava mišljenje da ćelijske deobe igraju glavnu ulogu i predstavljaju silu koja vodi ka razviću organa, odnosno celog organizma. Sa druge strane, teorija organizma podrazumeva postojanje unapred zamišljenog plana razvića (Kaplan i Hagemann 1991). Postoje literaturni podaci koji idu kako u prilog teorije organizma (Hemerly i sar. 1995; Boudolf i sar. 2004) tako i u prilog teorije ćelije (Andersen i sar. 2008).

Pokazano je da ometanje funkcije CDKB2 kod *A. thaliana* dovodi do pojave abnormalnosti ne samo kod toka ćelijskog ciklusa već i u organizaciji meristema (Andersen i sar. 2008). Ova zapažanja su ukazivala na to da su CDKs tipa B2 aktivne u apikalnom meristema izdanka i da su neophodne za njegovo funkcionisanje, kao i da je ta aktivnost ovih CDKs usko povezana sa funkcijama klasičnih regulatora meristema. Naime, regulatori ćelijskog ciklusa mogu služiti kao mete za integraciju ćelijske proliferacije sa diferencijacijom, morfogenezom i rastom (Gutierrez 2005). Smatra se da

bi upravo *CDKB2* geni mogli služiti kao potencijalne mete u okviru meristema izdanka (Andersen i sar. 2008).

Poznato je da nivoi auksina i citokinina kontrolišu ćelijski ciklus i mnoge programe razvića u biljci (Skoog i Miller 1957; Riou-Khamlichi i sar. 1999; Himanen i sar. 2002). Već dugo vremena se ovi hormoni koriste u indukciji *in vitro* regeneracije biljnog tkiva, pri čemu njihov odnos ne određuje samo stepen ćelijskih deoba, već i sudbinu razvića tkiva (Skoog i Miller 1957). Andersen i saradnici (2008) su pokazali da su endogeni nivoi ovih hormona bili izmenjeni u slučaju gubitka funkcije *CDKB2*. Naime, oni su zapazili da tkivo sa poremećenom funkcijom *CDKB2* nije moglo da prevede hormonske signale u pravilno razviće, uprkos činjenici da je tkivo bilo normalno u momentu izolacije eksplantata. To je dovelo do zaključka da je koordinacija ćelijskog ciklusa i programa razvića posredstvom biljnih hormona od izuzetne važnosti.

Sa druge strane, smatra se da citokinini kontrolišu tok ćelijskog ciklusa tako što utiču na fazno-specifičnu izmenu ciklina u kompleksu sa CDKs vezujući se za ATP mesto na CDKs (Planchais i sar. 1997). Citokinini regulišu prelazak iz G2 u M fazu (Redig i sar. 1996; Laureys i sar. 1998) tako što aktiviraju određeni tip fosfataza koje vrše uklanjanje inhibitorne fosfatne grupe sa odgovarajućih CDKs čime se povećava njihova aktivnost (Zhang i sar. 2005).

Različiti kompleksi CDK/ciklin mogu fosforilisati veliki broj supstrata koji učestvuju u regulaciji faznih prelaza, kao što su G1/S i G2/M, i omogućavanju odvijanja udvajanja DNK molekula i odvijanja mitoze. Ciklini H tipa čine regulatornu komponentu kompleksa CDKD/CYCH (Umeda i sar. 2005). Ovi kompleksi predstavljaju CDK-aktivirajuće kinaze koje vrše fosforilaciju kinaza zavisnih od ciklina i tako ih aktiviraju (Inzé 2005). S obzirom na to da ekspresija *CYCH;1* gena kod kelerabe prati obrazac ekspresije *CDKB2;1* i *CYCB2;4* gena tokom vremena, verovatno su se date promene odražavale i na aktivnost kompleksa CDKD/CYCH koji takođe predstavlja deo složene mašinerije koja reguliše ćelijski ciklus.

Na osnovu aktivnosti analiziranih gena možemo da pretpostavimo da su citokinini ispoljili uticaj na ćelijski ciklus tokom *in vitro* organogeneze izdanka kod BP kelerabe. Regulacija je vršena posredstvom *CDKB2;1* i *CYCB2;4* kao i *CYCH;1*

najverovatnije na nivou G2/M kontrolnog mesta. Najveće promene u ekspresiji u odnosu na kontrolu su uočene kod tretmanu sa TDZ u skoro svim vremenskim tačkama.



## 6. ZAKLJUČCI

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

1. Uspostavljen je efikasan sistem za regeneraciju kelerabe *in vitro* putem repetitivne somatske embriogeneze iz nezrelih zigotskih embriona na podlozi bez regulatora rastjenja.
2. Nezreli zigotski embrioni u ranom kotiledonarnom stadijumu su najpotentniji eksplantati za indukciju somatske embriogeneze.
3. Embriogeni potencijal kultura je održavan tokom dužeg vremenskog perioda zahvaljujući pojavi sekundarne somatske embriogeneze.
4. Uspešna indukcija indirektne *de novo* organogeneze kod dve sorte kelerabe, Bečka Plava i Bečka Bela, je postignuta gajenjem ekplantata na hranljivim podlogama sa citokininima, bez prethodnog auksinskog tretmana. Intaktni klijanci su pokazali najveću efikasnost regeneracije kao i vijabilnost regenerisanih izdanaka kod obe sorte, a najviša frekvencija regeneracije je postignuta na podlozi sa BAP ili TDZ za BP i sa BAP, TDZ ili *transZ* za BB.
5. Pokazano je da je *cisZ* biološki aktivan u procesu regeneracije izdanaka iz odsečaka hipokotila, kao i drugi testirani citokinini. *cisZ* se pokazao mnogo manje efikasan u odnosu na njegov *trans* izomer u regeneraciji izdanaka iz klijanaca kelerabe.
6. Indeks multiplikacije regenerisanih izdanaka na podlozi sa 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP je zavisio od genotipa.

7. Prisustvo IBA u koncentraciji od 4 mg L<sup>-1</sup> u hranljivoj podlozi za ožiljavanje je dovelo do povećanja frekvencije ožiljavanja kod obe sorte kelerabe u odnosu na 2 mg L<sup>-1</sup> IBA.
8. Biljke regenerisane putem somatske embriogeneze i organogeneze su uspešno aklimatizovane na uslove spoljašnje sredine.
9. Nivo endogenih citokinina je bio viši kod hipokotila sa regenerisanim izdancima u odnosu na klijance sa regenerisanim izdancima kod obe sorte kelerabe, što može biti posledica efikasnijeg usvajanja citokinina od strane odsečaka hipokotila.
10. Tretmani sa zeatinom su doveli do porasta nivoa ukupnih endogenih citokinina u odnosu na kontrolu kod oba tipa regeneranata obe sorte kelerabe, dok je prisustvo BAP i TDZ imalo mali ili nikakav efekat.
11. Primena egzogenih citokinina dovela je do porasta endogenog nivoa IAA kako u hipokotilima tako i u klijancima sa regenerisanim izdancima kod obe sorte u poređenju sa kontrolom.
12. Povišeni nivoi IAA u odsečcima hipokotila i klijancima kelerabe gajenih na podlogama sa citokininima su verovatno bili dovoljni da indukuju prvu fazu organogeneze u ovim eksplantatima bez potrebe za dodatnim auksinima u hranljivim podlogama.
13. Efikasnost regeneracije izdanaka kao i vijabilnost regenerisanih izdanaka je verovatno u korelaciji sa visokim odnosom endogene IAA i bioaktivnih citokinina prisutnim kod intaktnih klijanaca.
14. Praćenjem ekspresije gena ćelijskog ciklusa tokom *de novo* organogeneze indukovane citokininima kod klijanaca BP kelerabe, dobijeni su slični obrasci ekspresije *CDKB2;1*; *CYCB2;4* i *CYCH;1* gena. Promena aktivnosti analiziranih gena je bila u korelaciji sa određenim fazama *de novo* organogeneze.

15. Dobijeni rezultati predstavljaju polaznu osnovu za dalje rasvetljavanje mehanizama *de novo* organogeneze kod biljaka koje nisu uobičajeni model-sistemi za izučavanje procesa regeneracije *in vitro*.

## 7. LITERATURA

**Abbasi BH, Khan M, Guo B, Bokhari SA, Khan MA** (2011) Efficient regeneration and antioxidative enzyme activities in *Brassica rapa* var. turnip. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 105: 337-344.

**Agarwal S, Kanwar K, Sharma DR** (2004) Factors affecting secondary somatic embryogenesis and embryo maturation in *Morus alba* L. *Scientia Horticulturae* 102: 359-368.

**Ahmadabadi M, Bock R** (2010) Development of a highly responsive leaf-based regeneration system for *Peperomia* species. *Turkish Journal of Botany* 34: 329-334.

**Ahmed R, Gupta DS, De DN** (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf derived callus of winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.]. *Plant Cell Reports* 15: 531-535.

**Akasaka-Kennedy Y, Yoshida H, Takahata Y** (2005) Efficient plant regeneration from leaves of rape seed (*Brassica napus* L.): influence of AgNO<sub>3</sub> and genotype. *Plant Cell Reports* 24: 649-654.

**Akiyoshi DE, Klee H, Amasino RM, Nester EW, Gordon MP** (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 81: 5994-5998.

**Almeida AM, Parreira JR, Santos R, Duque AS, Francisco R, Tome DFA, Ricardo CP, Coelho AV, Fevereiro P** (2012) A proteomics study of the induction of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* using 2DE and MALDI-TOF/TOF. *Physiologia Plantarum* 146: 236-249.

**Andersen SU, Buechel S, Zhao Z, Ljung K, Novak O, Busch W, Schuster C, Lohmann JU** (2008) Requirement of B2-type cyclin dependent kinases for meristem integrity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 88–100.

**Aremu AO, Plačková L, Bairu MW, Novák O, Plíhalová L, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J** (2014a) How does exogenously applied cytokinin type affect growth and endogenous cytokinins in micropropagated *Merwillia plumbea*? *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 118: 245-256.

**Aremu AO, Plačková L, Bairu MW, Novák O, Szüčová L, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J** (2014b) Endogenous cytokinin profiles of tissue-cultured and acclimatized 'Williams' bananas subjected to different aromatic cytokinin treatments. *Plant Science* 214: 88-98.

**Armstrong DJ** (1994) Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In: Mok DWS, Mok MC (eds.) *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. Boca Raton: CRC Press, pp. 139-154.

**Ástot C, Dolezal K, Nordström A, Wang Q, Kunkel T, Moritz T, Chua NH, Sandberg G** (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97: 14778-14783.

**Atta R, Laurens L, Boucheron-Dubuisson E, Guivarc'h A, Carnero E, Giraudat-Pautot V, Rech P, Chriqui D** (2009) Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. *The Plant Journal* 57: 626-644.

**Auer CA, Cohen JD, Laloue M, Cooke TJ** (1992) Comparison of benzyl adenine metabolism in two *Petunia hybrida* lines differing in shoot organogenesis. *Plant Physiology* 98: 1035-1041.

**Bajguz A, Piotrowska A** (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* 70: 957-969.

**Balibrea Lara ME, Gonzalez Garcia MC, Fatima T, Ehneß R, Lee TK, Proels R, Tanner W, Roitsch T** (2004) Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant Cell* 16: 1276-1287.

**Barro F, Martin A** (1999) Response of different genotypes of *Brassica carinata* to microspore culture. *Plant Breeding* 118: 79-81.

**Barrôco RM, Van Poucke K, Bergervoet JHW, De Veylder L, Groot SPC, Inzé D, Engler G** (2005) The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant Physiology* 137: 127-140.

**Barry GF, Rogers SG, Fraley RT, Brand L** (1984) Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 81: 4776-4780.

**Bassil NV, Mok DWS, Mok MC** (1993) Partial purification of a *cis-trans*-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 102: 867-872.

**Beemster GTS, Baskin TI** (2000) STUNTED PLANT 1 mediates effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124: 1718-1727.

**Benková E, Witters E, Van Dongen W, Kolar J, Motyka V, Brzobohaty B, Van Onckelen HA, Machackova I** (1999) Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts: occurrence and changes due to light/dark treatment. *Plant Physiology* 121: 245-252.

**Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J** (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591-602.

**Berckmans B, De Veylder L** (2009) Transcriptional control of the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 599-605.

**Berleth T, Krogan NT, Scapella E** (2004) Auxin signals—turning genes on and turning cells around. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 553-563.

**Bertell G, Eliasson L** (1992) Cytokinin effects on root growth and possible interactions with ethylene and indole-3-acetic acid. *Physiologia Plantarum* 84: 255-261.

**Bhalla PL, De Weerd N** (1999) *In vitro* propagation of cauliflower, *Brassica oleracea* var. *botrytis* for hybrid seed production *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 56: 89-95.

**Bilyeu KD, Cole JL, Laskey JG, Riekhof WR, Esparza TJ, Kramer MD, Morris RO** (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology* 125: 378-386.

**Binns AN, Labriola J, Black RC** (1987) Initiation of auxin autonomy in *Nicotiana glutinosa* cells by the cytokini-biosynthesis gene from *Agrobacterium tumefaciens*. *Planta* 171: 539-548.

**Blilou I, Frugier F, Folmer S, Serralbo O, Willemsen V, Wolkenfelt H, Eloy NB, Ferreira PC, Weisbeck P, Scheres B** (2002) The *Arabidopsis* HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes and Development* 16: 566-575.

**Bones AM, Rossiter JT** (1996) The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum* 97: 194-208.

**Bones AM, Rossiter JT** (2006) The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* 67: 1053-1067.

**Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Van Dillen PW, Van der Noordaa J** (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 495-503.

**Boudolf V, Vlieghe K, Beemster GT, Magyar Z, Torres Acosta JA, Maes S, Van Der Schueren E, Inzé D, De Veylder L** (2004) The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2683-2692.

**Bourquin M, Pilet PE** (1990) Effect of zeatin on the growth and indolyl-3-acetic acid and abscisic levels in maize roots. *Physiologia Plantarum* 80: 342-349.

**Bouza L, Jacques M, Sotta B, Miginiac E** (1993) The differential effect of N<sup>6</sup>-benzyl-adenine and N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)-adenine on *in vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. is correlated with different hormone contents. *Plant Cell Reports* 12: 593-596.

**Brand U, Grünewald M, Hobe M, Simon R** (2002) Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 129: 565-575.

**Bretagne B, Chupeau MC, Chupeau Y, Fouilloux G** (1994) Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source. *Plant Cell Reports* 14:120-124.

**Brugière N, Jiao S, Hantke S, Zinselmeier C, Roessler JA, Niu X, Jones RJ, Habben JE** (2003) Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiology* 132: 1228-1240.

**Brzobohaty L, Cedzich A, Dopke C, Stransky H, Okumoto S** (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 34: 13-26.

**Buechel S, Leibfried A, To JPC, Zhao Z, Andersen SU, Kieber JJ, Lohmann JU** (2010) Role of A-type *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS* in meristem maintenance and regeneration. *European Journal of Cell Biology* 89: 279-284.

**Burbulis N, Kupriene R** (2005) Induction of somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of spring *Brassica napus*. *Acta Universitatis Latviensis ser. Biology* 691: 137-143.

**Burnett L, Arnaldo M, Yarrow S, Huang B** (1994) Enhancement of shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica rapa* ssp. *oleifera* through pretreatment with auxin and cytokinin and use of ethylene inhibitors. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 37: 253-256.

**Cardoza V, Stewart CN** (2004) *Brassica* biotechnology: progress in cellular and molecular biology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 40: 542-551.

**Carimi F, Pasquale De F, Crescimanno FG** (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of Citrus. *Plant Cell Reports* 18: 935-940.

**Cary AJ, Che P, Howell SH** (2002) Developmental events and shoot apicalmeristem gene expressionpatterns during shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 32: 867-877.

**Cedzich A, Stransky H, Schulz B, FrommerWB** (2008) Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiology* 148: 1857-1867.

**Centeno ML, Rodríguez A, Feito I, Fernández B** (1996) Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinia deliciosa* tissue cultures. *Plant Cell Reports* 16: 58-62.

**Chan JL, Saenz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C** (1998) Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 17: 515-521.

**Chatfield SP, Capron R, Severino A, Penttila PA, Alfred S, Nahal H, Provart NJ** (2013) Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: using a systems approach to probe early events in WUSCHEL-dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. *The Plant Journal* 73: 798-813.

**Che P, Gingerich DJ, Lall S, Howell SH** (2002) Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2771-2785.

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

**Che P, Lall S, Howell S** (2007) Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. *Planta* 226:1183-1194.



**Chen CM, Melitz DK** (1979) Cytokinin biosynthesis in a cell-free system from cytokinin autotrophic tobacco culture FEBS Letters 107: 15-20.

**Chen JT, Chang WCh** (2001) Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis and leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. Plant Growth Regulation 34: 229-232.

**Cheng ZJ, Wang L, Sun W, Zhang Y, Zhou C, Su YH, Li W, Sun TT, Zhao XY, Li XG, Cheng Y, Zhao Y, Xie Q, Zhang XS** (2013) Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. Plant Physiol 161: 240-251.

**Chikkala VRN, Nugent G, Dix P, Stevenson T** (2009) Regeneration from leaf explants and protoplasts of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower). Scientia Horticulturae 119: 330-334.

**Choi PS, Soh WY, Liu JR** (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotyledonary explant cultures of Chinese cabbage. Plant Cell Tissue and Organ Culture 44: 253-256.

**Choi PS, Min YA, Ahn MY, Soh WY, Liu JR** (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration in immature zygotic embryo, ovule, and anther filament cultures of Chinese cabbage. Scientia Horticulturae 72: 151-155.

**Choi SH, Ryu DK, Park S, Ahn KG, Lim YP, An G** (2010) Composition Analysis between Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) and Radish (*Raphanus sativus*) Korean Journal of Horticultural Science and Technology 28: 469-475.

**Choi YE, Kim HS, Soh WY, Yang DC** (1997) Development and structural aspects of somatic embryos formed on medium containing 2,3,5-triiodobenzoic acid. Plant Cell Reports 16: 738-744.

**Choi YE, Yang DC, Park JC, Soh WY, Choi KT** (1998) Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone free medium. Plant Cell Reports 17: 544-551.

**Christianson ML, Warnick DA** (1985) Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. Developmental Biology 12: 494-497.

**Chuck G, Hake S** (2005) Regulation of developmental transition. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 65-70.

**Cogbill S, Faulcon T, Jones G, McDaniel M, Harmon G, Blackmon R, Young M** (2010) Adventitious shoot regeneration from cotyledonary explants of rapid-cycling fast plants of *Brassica rapa* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 101: 127-133.

**Coenen C, Lomax TL** (1997) Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in Plant Science* 2: 351-356.

**Colasanti, J, Cho SO, Wick S, Sundaresan V** (1993) Localization of the functional p34-cdc2 homolog of maize in root tip and stomatal complex cells: Association with predicted division sites. *Plant Cell* 5: 1101-1111.

**Coleman GD, Ernst SG** (1989) In vitro shoot regeneration of *Populus deltoids*: effect of cytokinin and genotype. *Plant Cell Reports* 8: 459-462.

**Cooke TJ, Racusen RH, Cohen JD** (1993) The role of auxin in plant embryogenesis. *Plant Cell* 5: 1494-1495.

**Cuesta C, Novák O, Ordás RJ, Fernández B, Strnad M, Doležal K, Rodríguez A** (2012) Endogenous cytokinin profiles and their relationships to between-family differences during adventitious caulogenesis in *Pinus pinea* cotyledons. *Journal of Plant Physiology* 169: 1830-1837.

**Dai XG, Shi XP, Ye YM, Fu Q, Bao MZ** (2009) High frequency plant regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of ornamental kale. *Biologia Plantarum* 53: 769-773.

**Deane CR, Fuller MP, Dix PJ** (1997) Somatic embryogenesis in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Cruciferae Newsletter* 19: 43-44.

**De Smet I, Lau S, Mayer U, Jurgens G** (2010) Embryogenesis-the humble beginnings of plant life. *The Plant Journal* 61: 959-970.

**Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J** (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198: 532-541.

**Del Pozo JC, Boniotti MB, Guitierrez C** (2002) *Arabidopsis* E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF (AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* 14: 3057-3071.

**Del Pozo JC, Lopez-Matas MA, Ramirez-Parra E, Guitierrez C** (2005) Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum* 123: 173-183.

**Dewitte W, Chiappetta A, Azmi A, Witters E, Strnad M, Rembur J, Noin M, Chriqui D, Van Onckelen H** (1999) Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day-neutral tobacco during floral transition and flower formation. *Plant Physiology* 119: 111-122.

**Dewitte W, Murray JAH** (2003) The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* 54: 235-264.

**Dewitte W, Scofield S, Alacasabas AA, Maughan SC, Menges M, Braun N, Collins C, Nieuwland J, Prinsen E, Sundaresan V** (2007) *Arabidopsis* CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104: 14537-14542.

**Dias JS, Martins MG** (1999) Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different *Brassica oleracea* morphotypes. *Scientia Horticulturae* 82: 299-307.

**Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ** (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin proteasome pathway. *Genes and Development* 11: 957-972.

**Dmitrović S, Simonović A, Mitić N, Savić J, Cingel A, Filipović B, Ninković S** (2015) Hairy root exudates of allelopathic weed *Chenopodium murale* L. induce oxidative stress and down-regulate core cell cycle genes in *Arabidopsis* and wheat seedlings *Plant Growth Regulation* 75: 365-382.

**Dobrev P, Kamínek M** (2002) Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 950: 21-29.

**Dobrev P, Havlíček L, Vágner M, Malbeck J, Kamínek M** (2005) Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1075: 159-166.

**Dong Q, Zhao Y, Jiang H, He H, Zhu S, Cheng B, Xiang Y** (2011) Genome-wide identification and characterization of the cyclin gene family in *Populus trichocarpa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 107: 55-67.

**Doonan JH** (1998) Cell division during floral morphogenesis in *Antirrhinum majus*. In: Francis D, Dudits D, Inzé D (eds.) *Plant Cell Division*. Portland Press, London, pp. 207-222.

**Duclercq J, Sangwan-Norreel B, Catterou M, Sangwan RS** (2011) *De novo* shoot organogenesis: From art to science. *Trends in Plant Science* 16: 597-606.

**Dudits D, Bogre L, Balco L, Dedeoglu D, Magyar Z, Kapros T, Felfoldi F, Gyorgyey J** (1993) Key components of cell cycle control during auxin-induced cell division. In: Ormrod J, Framcos D (eds.) *Molecular and Cell Biology of the Plant Cell Cycle* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 111-131.

**Dudits D, Gyorgyey J, Bogre L, Bako L** (1995) Molecular biology of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (ed.) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/ London, pp. 267-308.

**Duke C, Macleod J, Summons R, Letham D, Parker C** (1978) The structure and synthesis of cytokinin metabolites. II. Lupinic acid and O- $\beta$ -D-glucopyranosylzeatin from *Lupinus angustifolius*. *Australian Journal of Chemistry* 31: 1291-1301.

**Dwivedi S, Vaňková R, Motyka V, Herrera C, Žižková E, Auer C** (2010) Characterization of *Arabidopsis thaliana* mutant ror-1 (roscovitine-resistant) and its utilization in understanding of the role of cytokinin N-glucosylation pathway in plants. *Plant Growth Regulation* 61: 231-242.

**Elhiti M, Stasolla C, Wang A** (2013) Molecular regulation of plant somatic embryogenesis In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 49: 631-642.

**Eklöf S, Åstot C, Blackwell J, Moritz T, Olsson O, Sandberg G** (1997) Auxin-cytokinin interactions in wild-type and transgenic tobacco. *Plant Cell Physiology* 38: 225-235.

**Emery RJN, Leport L, Barton JE, Turner NC, Atkins CA** (1998) *cis*-Isomers of cytokinins predominate in chickpea seeds throughout their development. *Plant Physiology* 117: 1515-1523.

**Emery RJN, Ma Q, Atkins CA** (2000) The forms and sources of cytokinins in developing white lupine seeds and fruits. *Plant Physiology* 123: 1593-1604.

**Escalona VH, Aguayo E, Artés E** (2007) Extending the shelf life of kohlrabi stems by modified atmosphere packaging. *Journal of Food Science* 72: 308-313.

**Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P** (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56: 5-51.

**Fahey JW, Stephenson KK, Wade KL, Talalay P** (2013) Urease from *Helicobacter pylori* is inactivated by sulforaphane and other isothioyanates. *Biochemical and Biophysical Research. Communication* 435: 1-7.

**Fehér A, Pasternak T, Ötvös K, Miskolczi P, Dudits D** (2002) Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biologia* 57: 5–12.

**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.

**Feiler HS, Jacobs TW** (1990) Cell division in higher plants: A *cdc2* gene, its 34-kDa product, and histone H1 kinase activity in pea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87: 5397-5401.

**Ferreira, PCG, Hemerly AS, Villarroel R, Van Montagu M, Inzé D** (1991) The *Arabidopsis* functional homolog of the p34cdc2 protein kinase. *Plant Cell* 3: 531-540.

**Filonova L, Bozhkov P, Von Arnold S** (2000) Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany* 51: 249-264.

**Fiore CM, Trabace T, Sunseri F** (1997) High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 16: 295-298.

**Fleming AJ** (2006) The co-ordination of cell division, differentiation and morphogenesis in the shoot apical meristem: A perspective. *Journal of Experimental Botany* 57: 25-32.

**Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz EM** (1999) Communication of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283: 1911-1914.

**Fobert PR, Coen ES, Murphy GJP, Doonan JH** (1994) Patterns of cell division revealed by transcriptional regulation of genes during the cell cycle in plants. *EMBO Journal* 13: 616-624.

**Fobert PR, Gaudin V, Lunness P, Coen ES, Doonan JH** (1996) Distinct classes of *cdc2*-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* 8: 1465-1476.

**Francis D, Sorrell DA** (2001) The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *Plant Growth Regulation* 33: 1-12.

**Fuller MP, Strullu DG, Schlessler A** (1994) The regeneration of shoots from seedling explants of cauliflower. *Cruciferae Newsletter* 16: 53-54.

**Gahan PB, George EF** (2008) Adventitious regeneration. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds.) *Plant propagation by tissue culture*, 3rd Edn. Springer, Dordrecht, pp. 355-401.

**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.

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

**Gajdošová S, Spíchal L, Kamínek M, Hoyerová K, Novák O, Dobrev PI, Galuszka P, Klíma P, Gaudinová A, Žižková E, Hanuš J, Dančák M, Trávníček B, Pešek B, Krupička M, Vaňková R, Strnad M, Motyka V** (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany* 62: 2827-2840.

**Galuszka P, Popelková H, Werner T, Frébortvá J, Pospíšilová H, Mik V, Köllmer I, Schmülling T, Frébort I** (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 255-267.

**Gamet PL, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S, Gasc N, Tulliez J, Terce F** (2000) Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Research* 60: 1426-1433.

**Gardiner JB, Morra MJ, Eberlein CV, Brown PD, Borek V** (1999) Allelochemicals released in soil following incorporation of rapessed (*Brassica napus*) green manures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3837-3842.

**Garin E, Isabel N, Plourde A** (1998) Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos. *Plant Cell Reports* 18: 37-43.

**Gašić K, Hernandez A, Korban SS** (2004) RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 437a-437g.

**Ghnaya AB, Charles G, Branchard M** (2008) Rapid shoot regeneration from thin cell layer explants excised from petioles and hypocotyls in four cultivars of *Brassica napus* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 92: 25-30.

**Glendening TM, Sjolund R** (1988) *In vitro* propagation of kohlrabi from leaf explants. *HortScience* 23: 772.

**Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P, Meyerowitz EM** (2007) Pattern formation during *de novo* assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development* 134: 3539-3548.

**Gordon SP, Chickarmane VS, Ohno C, Meyerowitz EM** (2009) Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106: 16529-16534.

**Grafi G, Chalifa-Caspi V, Nagar T, Plaschkes I, Barak S, Ransbotyn V** (2011) Plant response to stress meets dedifferentiation. *Planta* 233: 433-438.

**Grosch R, Schneider JHM, Kofoet A** (2004) Characterisation of *Rhizoctonia solani* anastomosis groups causing bottom rot in field-grown lettuce in Germany. *European Journal of Plant Pathology* 110: 53-62.

**Grubben, GJH, Denton OA** (Eds.) (2004) *Plant Resources of Tropical Africa 2. Vegetables*. PROTA Foundation, Wageningen, Netherlands. Backhuys Publishers, Leiden/CTA, Wageningen, 668 pp.

**Guideroni E, Mérot B, Eksomtramage T, Paulet F, Feldmann P, Glaszmann JC** (1995) Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* species). In: Bajaj YPS (ed.) *Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 31. Springer, Berlin, pp. 92-113.

- Gutierrez C** (2005) Coupling cell proliferation and development in plants. *Nature Cell Biology* 7: 535-541.
- Haberer G, Kieber JJ** (2002) Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiology* 128: 354-362.
- Haccius B** (1978) Question of unicellular origin of non-zigotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology* 28: 74-81.
- Haddadi P, Moieni A, Karimzadeh G, Abdollahi MR** (2008) Effects of gibberellin, abscisic acid and embryo desiccation on normal plantlet regeneration, secondary embryogenesis and callogenesis in microspore culture of *Brassica napus* L. cv. PF<sub>704</sub>. *International Journal of Plant Production* 2: 153-162.
- Hansen LN, Ortiz R, Andersen SB** (1999) Genetic analysis of protoplast regeneration ability in *Brassica oleracea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 58: 127-132.
- Harbaum B, Hubbermann EM, Wolff C, Herges R, Zhu Z, Schwarz K** (2007) Identification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in pak choi varieties (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) by HPLC-ESI-MSn and NMR and their quantification by HPLC-DAD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8251-8260.
- Hartig K, Beck E** (2005a) Endogenous cytokinin oscillations control cell cycle progression of tobacco BY-2 cells. *Plant Biology* 7: 33-41.
- Hartig K, Beck E** (2005b) Assessment of lovastatin application as tool in probing cytokinin-mediated cell cycle regulation. *Physiologia Plantarum* 125: 260-267.
- Hartig K, Beck E** (2006) Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biology* 8: 389-396.
- Hashimoto J, Hirabayashi T, Hayano Y, Hata S, Ohashi Y, Suzuka I, Utsugi T, Toh EA, Kikuchi Y** (1992) Isolation and characterization of cDNA clones encoding cdc2 homologues from *Oryza sativa*: A functional homologue and cognate variants. *Molecular Genetics and Genomics* 233: 10-16.
- Hassan EA, Hussein A, El-Awadi ME** (2011) Kohlrabi (*Brassica caulorapa* L): A potent anticancer vegetable processed in baked biscuits. *Nature and Science* 9: 149-157.



**Hayes JD, Kelleher MO, Eggleston IM** (2008) The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *European Journal of Nutrition* 47: 73-88.

**Hemerly A, Engler Jde A, Bergounioux C, Van Montagu M, Engler G, Inzé D, Ferreira P** (1995) Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO Journal* 14: 3925-3936.

**Hibara K-i, Takada S, Tasaka M** (2003) *CUC1* gene activates the expression of *SAM*-related genes to induce adventitious shoot formation. *The Plant Journal* 36: 687-96.

**Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, De Almeida Engler J, Inzé D, Beeckman T** (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14: 2339-2351.

**Hindley J, Phear GA** (1984) Sequence of the cell division gene *CDC2* from *Schizosaccharomyces pombe*: patterns of splicing and homology to protein kinases. *Gene* 31: 129-134.

**Horgan R, Hewett EW, Purse JG, Wareing PF** (1973) A new cytokinin from *Populus robusta*. *Tetrahedron Letters* 14: 2827-2828.

**Hou B, Lim EK, Higgins GS, Bowles DJ** (2004) *N*-Glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 47822-47832.

**Houba-Herlin N, Pethe C, D'Alayer J, Laloue M** (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *The Plant Journal* 17: 615-626.

**Howell SH, Lall S, Che P** (2003) Cytokinins and shoot development. *Trends in Plant Science* 8: 453-459.

**Hu Q, Anderson SB, Hansen LN** (1999) Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 59: 189-196.

**Hwang I, Sheen J** (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383-389.

**Ilić-Grubor K, Attree SM, Fowke LC** (1998) Induction of microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. with polyethylene glycol (PEG) as osmoticum in a low sucrose medium Plant Cell Reports 17: 329-333.

**Inzé D** (2005) Green light for the cell cycle. EMBO Journal 24: 657-662.

**Inzé D, De Veylder L** (2006) Cell cycle regulation in plant development. Annual Review of Genomics and Human Genetics 40: 77-105.

**Iori R, Bernardi R, Gueyrard D, Rollin P, Pilmieri S** (1999) Formation of glucoraphanin by chemoselective oxidation of natural glucoerucin: a chemoenzymatic route to sulforaphane. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 9: 1047-1048.

**Ishida M, Hara M, Fukino N, Kakizaki T, Morimitsu Y** (2014) Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. Breeding Science 64: 48-59.

**Izumi K, Nakagawa S, Kobayashi M, Oshio H, Sakurai A, Takahashi N** (1988) Levels of IAA, cytokinins, ABA and ethylene in rice plants as affected by a gibberellin biosynthesis inhibitor, Uniconazole-P. Plant Cell Physiology 29: 97-104.

**Jacqmard A, Detry N, Dewitte W, Van Onckelen H, Bernier G** (2002) *In situ* localisation of cytokinins in the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral transition. Planta 214: 970-973.

**Jensen WA** (1962) Botanical Histochemistry: Principles and Practice. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 408 pp.

**Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M** (2005) KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. Current Biology 15: 1560-1565.

**Jiménez VM** (2001) Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal (Brazilian Journal of Plant Physiology) 13: 196-223.

**Jiménez VM, Bangerth F** (2001). Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and nonembryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. Plant Science 160: 247-257.

**Jiménez M (2005)** Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* 47: 91-110.

**Jin RG, Liu YB, Tabashnik BE, Borthakur D (2000)** Development of transgenic cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) for insect resistance by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 36: 231-237.

**John PCL, Zhang K, Dong C, Diederich L, Wightman F (1993)** P34-cdc2 related proteins in control of cell cycle progression, the switch between division and differentiation in tissue development, and stimulation of division by auxin and cytokinin. *Australian Journal of Plant Physiology* 20: 503-526.

**Jones B, Gunnerås AS, Petersson SV, Tarkowski P, Graham N, May S, Dolezal K, Sandberg G, Ljung K (2010)** Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *Plant Cell* 22: 2956-2969.

**Jones TJ, Rost TL (1989)** The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. *Botanical Gazette* 150: 41-49.

**Joubés J, Chevalier C (2000)** Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology* 43: 735-745.

**Joubés J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inzé D, Umeda M, Renaudin JP (2000)** CDK-related protein kinases in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 607-620.

**Kakimoto T (2001)** Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiology* 42: 677-685.

**Kakimoto T (2003)** Biosynthesis of cytokinins. *Plant Research* 116: 233-239.

**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 - Plant* 25: 1163-1116.

**Kamada H, Ishikawa K, Saga H, Harada H (1993)** Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tiss. somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. Plant Tissue Culture Letters* 10: 38-44.

**Kamal GB, Ilich KG, Asadollah A** (2007) Effect of genotype, explant type and nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot *in vitro* organogenesis. African Journal of Biotechnology 6: 861-867.

**Kamínek M, Pačes V, Corse J, Challice JS** (1979) Effect of stereospecific hydroxylation of N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenosine on cytokinin activity. Planta 145: 239-243.

**Kamínek M, Motyka V, Vaňková R** (1997) Regulation of cytokinin content in plant cells. Physiologia Plantarum 101: 689-700.

**Kamle M, Bajpai A, Chandra R, Kalim S, Kumar R** (2011) Somatic embryogenesis for crop improvement. GEF Bulletin of Biosciences 2: 54-59.

**Kapusta-Duch J, Kopeć A, Piatkowska E, Borczak B, Leszczyńska T** (2012) The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny 63: 389-395.

**Kaplan DR, Hagemann W** (1991) The relationship of cell and organism in vascular plants - Are cells the building-blocks of plant form? Bioscience 41: 693-703.

**Kasahara H, Takei K, Ueda N, Hishiyama S, Yamaya T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sakakibara H** (2004) Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. Journal of Biological Chemistry 279: 14049-14054.

**Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A** (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28: 1647-1649.

**Khan MR, Rashid H, Ansar M, Chaudry Z** (2003) High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in Canola (*Brassica napus*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 75: 223-231.

**Kim SW, Oh SC, Liu JR** (2003) Control of direct and indirect somatic embryogenesis by exogenous growth regulators in immature zygotic embryo cultures of rose. Plant Cell Tissue and Organ Culture 74: 61-66.

**Kim YW, Youn Y, Noh ER, Kim JC** (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima*. Plant Cell Reports 16: 869-873.

**Klemš M, Slámová Z, Motyka V, Malbeck J, Trávníčková A, Macháčková I, Holík J, Procházka S** (2011) Changes in cytokinin levels and metabolism in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) explants during *in vitro* shoot organogenesis induced by *trans*-zeatin and dihydrozeatin. *Plant Growth Regulation* 65: 427-437.

**Klíma M, Vyvadilová M, Kučera V** (2004) Production and utilization of doubled haploids in *Brassica oleracea* vegetables. *Horticultural Science (Prague)* 31: 119-123.

**Koh WL, Loh CS** (2000) Direct somatic embryogenesis, plant regeneration and *in vitro* flowering in rapid-cycling *Brassica napus*. *Plant Cell Reports* 19: 1177-1183.

**Kohlenbach HW** (1977) Basic aspects of differentiation and plant regeneration from cell and tissue cultures. In: Barz W (ed.) *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application*. Springer, Berlin, pp. 355-366.

**Konar RN, Thomas E, Street HE** (1972) Origin and structure of embryoids arising from the epidermal cells of *Ranunculus sceleratus* L. *Journal of Cell Science* 11: 77-93.

**Kyozuka J** (2007) Control of shoot and root meristem function by cytokinin. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 442-446.

**Laureys F, Dewitte W, Witters E, Van Montagu M, Inzé D, Van Onckelen H** (1998) Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters* 426: 29-32.

**Laux T** (2003) The stem cell concept in plants: a matter of debate. *Cell* 113: 281-283.

**Lee DJ, Park JY, Ku SJ, Ha YM, Kim S, Kim MD, Oh MH, Kim J** (2007) Genome-wide expression profiling of *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7)* overexpression in cytokinin response. *Molecular Genetics and Genomics* 277: 115-137.

**Lee J, Das A, Yamaguchi M, Hashimoto J, Nobuhiro Tsutsumi N, Uchimiya H, Umeda M** (2003) Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with a B-type cyclin-dependent kinase. *The Plant Journal* 34: 417-425.

**Lenhard M, Jürgens G, Laux T** (2002) The *WUSCHEL* and *SHOOTMERISTEMLESS* genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development* 129: 3195-3206.

**Letham DS** (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. Life Sciences 8: 569-573.

**Letham DS** (1994) Cytokinins as phytohormones – sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. In: Mok DWS, Mok MC (eds.) Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. CRC Press, Boca Raton, pp. 57-80.

**Leroy XJ, Leon K, Charles G, Branchard M** (2000) Cauliflower somatic embryogenesis and analysis of regenerant stability by ISSRs. Plant Cell Reports 19:1102-1107.

**Lexa M, Genkov T, Malbeck J, Macháčková I, Brzobohatý B** (2003) Dynamics of endogenous cytokinin pools in tobacco seedlings: A modelling approach. Annals of Botany 91: 585-597.

**Lew DJ, Dulic V, Reed SI** (1991) Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. Cell 66: 1197-1206.

**Lillo C, Shanin EA** (1986). Rapid regeneration of plants from hypocotyl protoplasts and root segments of cabbage. Horticultural Science 21: 315-317.

**Linsmaier EM, Skoog F** (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 18: 100-127.

**Liu CM, Xu ZH, Chua NH** (1993) Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. Plant Cell 5: 621–630.

**Liu G, Jin S, Liu X, Tan J, Yang X, Zhang X** (2012) Overexpression of Arabidopsis cyclin D2;1 in cotton results in leaf curling and other plant architectural modifications. Plant Cell Tissue and Organ Culture 110: 26-273.

**Liu J, Mehdi S, Topping J, Tarkowski P, Lindsey K** (2010) Modelling and experimental analysis of hormonal crosstalk in *Arabidopsis*. Molecular Systems Biology 6: Article number 373.

**Lo Schiavo F, Pitto L, Giuliano G, Torti G, Nuti-Ronchi V, Marazziti D, Veraga R, Orselli S, Terzi M** (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by maturation, differentiation, hormones and hypomethylation drugs. Theoretical and Applied Genetics 77: 325.

**Long JA, Moan EI, Medford JI, Barton MK** (1996) A member of the knotted class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379: 66-69.

**Lorbiecke R, Sauter M** (1999) Adventitious root growth and cell-cycle induction in deepwater rice. *Plant Physiology* 119: 21-30.

**Magyar-Tábori K, Dobránszki J, da Silva JAT, Bulley SM, Hudák I** (2010) The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 101: 251-67.

**Martin RC, Mok MC, Mok DW** (1999a) A gene encoding the cytokinin enzyme zeatin O-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* 120: 553-558.

**Martin RC, Mok MC, Mok DW** (1999b) Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 284-289.

**Martin RC, Mok MC, Habben JE, Mok DWS** (2001) A cytokinin gene from maize encoding an O-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98: 5922-5926.

**Martinelli L, Candioli E, Costa D, Poletti V** (2001) Morphogenic competence of *Vitis rupestris* S. secondary somatic embryos with a long culture history. *Plant Cell Reports* 20: 279-284.

**Mayer KF, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgen G, Laux T** (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95: 805-815.

**Mazid M, Khan TA, Mohammad F** (2011) Cytokinins, a classical multifaceted hormone in plant system. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 7: 347-368.

**Meek L, Martin RC, Shan X, Karplus PA, Mok DWS, Mok MC** (2008) Isolation of legume glycosyltransferases and active site mapping of the *Phaseolus lunatus* zeatin O-glucosyltransferase ZOG1. *Journal of Plant Growth Regulation* 27: 192-201.

**Meijer M, Murray JAH** (2000) The role and regulation of D-type cyclins in the plant cell cycle. *Plant Molecular Biology* 43: 621-633.

**Meijón M, Cañal MJ, Fernández H, Rodríguez A, Fernández B, Rodríguez R, Feito I** (2011) Hormonal profile in vegetative and floral buds of azalea: levels of polyamines, gibberellins, and cytokinins. *Journal of Plant Growth Regulation* 30: 74-82.

**Melaragno J, Mehrota B, Coleman A** (1993) Relationship between endoploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5: 1661-1668.

**Menges M, De Jager SM, Gruissem W, Murray JA** (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal* 41: 546-566.

**Miao GH, Hong Z, Verma DPS** (1993) Two functional soybean genes encoding p34-cdc2 protein kinases are regulated by different plant developmental pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 943-947.

**Miller CO, Skoog F, Okumura FS, Von Saltza MH, Strong FM** (1955a) Structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemical Society* 77: 2662-2663.

**Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong FM** (1955b) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* 77: 1329.

**Miller CO, Skoog F, Okumura FS, von Saltza MH, Strong FM** (1956). Isolation, structure and synthesis of kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* 78: 1375-1380.

**Mironov V, DeVeylder L, Van Montague M, Inzé D** (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants—the nexus. *Plant Cell* 11: 509-521.

**Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T** (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* 37: 128-138.

**Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S, Sandberg G, Kakimoto T** (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103: 16598-16603.

**Moghaieb R, El-Awady M, El Mergawy R, Youssef S, El-Sharkawy A** (2006) A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (*Brassica napus* L.). *African Journal of Biotechnology* 5: 143-148.



**Mok DW, Mok MC, Armstrong DJ, Shudo K, Isogai Y** (1982) Cytokinin activity of *N*-phenyl-*N'*-1,2,3-thidiazol-5-ylurea (Thidiazuron). *Phytochemistry* 21: 1509-1511.

**Mok MC, Martin RC, Mok DWS** (2000) Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 36: 102-107.

**Mok DW, Mok MC** (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology* 52: 89-118.

**Mok MC, Martin RC, Dobrev PI, Vankova R, Ho PS, Yonekura-Sakakibara K, Sakakibara H, Mok DWS** (2005) Topolins and hydroxylated thidiazuron derivatives are substrates of cytokinin *O*-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. *Plant Physiology* 137: 1057-1066.

**Mollika SR, Sarker RH, Hoque MI** (2011) *In vitro* plant regeneration in *Brassica spp.* *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 21: 127-134.

**Moncaleán P, Rodríguez A, Fernández B** (2003) Effect of different benzyladenine time pulses on the endogenous levels of cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid in micropropagated explants of *Actinidia deliciosa*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 149-155.

**Montalbán IA, Novák O, Rolčik J, Strnad M, Moncaleán P** (2013) Endogenous cytokinin and auxin profiles during *in vitro* organogenesis from vegetative buds of *Pinus radiata* adult trees. *Physiologia Plantarum* 148: 214-231.

**Montero-Cortés M, Rodríguez-Paredes F, Burgeff C, Pérez-Nuñez T, Cordova I, Oropeza C, Verdeil J-L, Saénz L** (2010) Characterisation of a cyclin-dependent kinase (CDKA) gene expressed during somatic embryogenesis of coconut palm. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 102: 251-258.

**Mordhorst AP, Voerman KJ, Hartog MV, Meijer EA, VanWent J, Koornneef M, DeVries SC** (1998) Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutation in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics* 149: 549-563.

**Mordhorst AP, Hartog MV, El Tamer MK, Laux T, De Vries SC** (2002) Somatic embryogenesis from *Arabidopsis* shoot apical meristem mutants. *Planta* 214: 829-836.

**Morris RO, Blevins DG, Dietrich JT, Durley RC, Gelvin SB, Gray J, Hommes NG, Kamínek M, Mathesius U, Meilan R, Reinbott TM, Sayavedra-Soto L** (1993) Cytokinins in plant pathogenic bacteria and developing cereal grains. *Australian Journal of Plant Physiology* 20: 621-637.

**Morris RO, Bilyeu KD, Laskey JG, Cheikh NN** (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 255: 328-333.

**Motte H, Vereecke D, Geelen D, Werbrouck S** (2014) The molecular path to *in vitro* shoot regeneration. *Biotechnology Advances* 32: 107-121.

**Motyka V, Vaňková R, Čapková V, Petrášek J, Kamínek M, Schmölling T** (2003) Cytokinin-induced upregulation of cytokinin oxidase activity in tobacco includes changes in enzyme glycosylation and secretion. *Physiology Plantarum* 117: 11-21.

**Moura** (2009) *In vitro* propagation of *Viburnum treleasei* gand., an Azorean endemic with high ornamental interest. *HortScience* 44: 1668-1671.

**Msikita W, Skirvin RM** (1989) *In vitro* regeneration from hypocotyl and seedling cotyledons of tronchuda (*Brassica oleracea* var. *tronchuda* Bailey). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 19:159-165.

**Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

**Nandi SK, Letham DS, Palni LMS, Wong OC, Summons RE** (1989) 6-Benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins. *Plant Science* 31: 189-196.

**Navazio J** (2012) *A Farmer's Guide to Vegetable Seed Production, Brassicacea*. Chelsea Green Publishing, Vermont, pp. 159-174.

**Neelakandan AK, Wang K** (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications *Plant Cell Reports* 31: 597-620.

**Nicander B, Bjorkman PO, Tillberg E** (1995) Identification of an N-glucoside of *cis*-zeatin from potato tuber sprouts. *Plant Physiology* 109: 513-516.

**Nieuwland J, Maughan S, Dewitte W, Scofield S, Sanz L, Murray JAH** (2009) The D-type cyclin CYCD4;1 modulates lateral root density in *Arabidopsis* by affecting the basal meristem region. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 106: 22528-22533.

**Nikolić R, Mitić N, Miletić R, Nešković M** (2006) Effects of cytokinins on *in vitro* seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. Journal of Plant Growth Regulation 25: 187-194.

**Noodén LD, Letham DS** (1993) Cytokinin metabolism and signalling in the soybean plant. Australian Journal of Plant Physiology 20: 639-653.

**Nordström A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Åstot C, Dolezal K, Sandberg G** (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 101: 8039-8044.

**Oinam G, Yeung E, Kurepin L, Haslam T, Villalobos A** (2011) Adventitious root formation in ornamental plants: I. General overview and recent successes. Propagation of Ornamental Plants 1: 78-90.

**Okubo H, Wada K, Uemoto S** (1991) *In vitro* morphogenetic response and distribution of endogenous plant hormones in hypocotyl segment of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.). Plant Cell Reports 10: 501-504.

**Ono Y, Takahata Y, Kaizuma N** (1994) Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L.) Plant Cell Reports 14: 13-17.

**Ori N, Juarez MT, Jackson D, Yamaguchi J, Banowitz GM, Hake S** (1999) Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knotted1* under the control of a senescence-activated promoter. The Plant Cell 11: 1073-1080.

**Otto F** (1988) High resolution DNA - flow cytometry using DAPI, Protocol 1. Partec Arlesheim, Münster.

**Ovesná J, Ptacek L, Opatrny Z** (1993) Factors influencing the regeneration capacity of oilseed rape and cauliflower in transformation experiments. Biologia Plantarum 35: 107-112.

**Pal AK, Acharya K, Ahuja PS** (2012) Endogenous auxin level is a critical determinant for *in vitro* adventitious shoot regeneration in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 21: 205-12.

**Park SY, Ahn JK, Lee WY, Murthy HN, Paek KY** (2005) Mass production of *Eleutherococcus koreanum* plantlets via somatic embryogenesis from root cultures and accumulation of eleutherosides in regenerants. *Plant Science* 168: 1221-1225.

**Parker CW, Entsch B, Letham DS** (1986) Inhibitors of two enzymes which metabolize cytokinins. *Phytochemistry* 25: 303-310.

**Parker CW, Badenoch-Jones J, Letham DS** (1989) Radioimmunoassay for quantifying the cytokinins cis-zeatin and cis-zeatin riboside and its application to xylem sap samples. *Journal of Plant Growth Regulation* 8: 93-105.

**Pasternak T, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard Van Onckelen H, 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 (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* 129: 1807–1819.

**Paul S, Sikdar SR** (2005) Regeneration of plants from root explant of two Indian cultivars of *Brassica campestris* L. through somatic embryogenesis. *Current Science* 89: 1323-1326.

**Pavlović S, Vinterhalter B, Mitić N, Adžić S, Pavlović N, Zdravković M, Vinterhalter D** (2010) *In vitro* shoot regeneration from seedling explants in *Brassica* vegetables: red cabbage, broccoli, Savoy cabbage and cauliflower. *Archives of Biological Sciences* 62: 337-345.

**Pellegrineschi A** (1997) *In vitro* plant regeneration via organogenesis of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *Plant Cell Reports* 17: 89-95.

**Pennell RI, Janniche L, 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.

**Pernisová M, Klíma P, Horák J, Válková M, Malbeck J, Souček P, Reichman P, Hoyerová K, Dubová J, Friml J, Zažímalová E, Hejátko J** (2009) Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106: 3609-3614.

**Petersen, J. Belz R, Walker F, Karl Hurlle K** (2001) Weed suppression by release of isothiocyanates from turnip-rape mulch. *Agronomy Journal* 93: 37-43.

**Pillon E, Terzi M, Baldan B, Mariani P, Lo Schiavo F** (1996) A protocol for obtaining embryogenic cell lines from *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 9: 573-577.

**Pintos B, Martín JP, Centeno ML, Villalobos N, Guerra H, Martín L** (2002) Endogenous cytokinin levels in embryogenic and non-embryogenic calli of *Medicago arborea* L. *Plant Science* 163: 955-960.

**Planchais S, Glab N, Tréhin C, Perennes C, Bureau JM, Meijer L, Bergounioux C** (1997) Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, characterizes restriction point and G2/M transition in tobacco BY-2 cell suspension. *The Plant Journal* 12: 191-202.

**Popelková H, Galuszka P, Frébortová J, Bilyeu KD, Frébort I** (2004) Cytokinin dehydrogenase: Characterization and structure homology modeling of the flavoprotein catabolizing plant hormones cytokinins. In: Pandalai SG (ed.) *Recent Research Developments in Proteins*, Vol. 2. Transworld Research Network, Kerala, pp. 63-81.

**Potuschak T, Doerner P** (2001) Cell cycle controls: genome-wide analysis in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 501-506.

**Proels RK, Roitsch T** (2009) Extracellular invertase LIN6 of tomato: a pivotal enzyme for integration of metabolic, hormonal, and stress signals is regulated by diurnal rhythm. *Journal of Experimental Botany* 60: 1555-1567.

**Qin Y, Li HL, GuoY** (2007) High-frequency embryogenesis, regeneration of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and analysis of genetic stability by RAPD. *Scientia Horticulturae* 111: 203-208.

**Quint M, Gray WM** (2006) Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 448-453.

**Raemakers CJJM, Jacobsen E, Visser RGF** (1995) Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81: 93-107.

**Rai MK, Akhtar N, Jaiswal VS** (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. *Scientia Horticulturae* 113: 129-133.

**Rakow G** (2004) Species origin and economic importance of *Brassica*. In: Pua EC and C. J. Douglas CJ (eds.) Biotechnology in agriculture and forestry, Brassica Vol. 54. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 3-11.

**Rashotte AM, Carson SDB, To JPC, Kieber JJ** (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. Plant Physiology 132: 1998-2011.

**Rashotte AM, Mason MG, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ** (2006) A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 103: 11081-11085.

**Raspor M, Motyka V, Žižková E, Dobrev PI, Trávníčková A, Zdravković-Korać S, Simonović A, Ninković S, Dragičević IC** (2012) Cytokinin profiles of *AtCKX2*-overexpressing potato plants and the impact of altered cytokinin homeostasis on tuberization *in vitro*. Journal of Plant Growth Regulation 31: 460-470.

**Ravanfar SA, Aziz MA, Kadir MA, Rashid AA, Haddadi F** (2011) *In vitro* adventitious shoot regeneration and acclimatisation of *Brassica oleracea* subsp. *italica* cv. Green Marvel. African Journal of Biotechnology 10: 5614-5619.

**Ravanfar SA, Aziz MA, Rashid AA, Salim S** (2014) *In vitro* adventitious shoot regeneration from cotyledon explant of *Brassica oleracea* subsp. *italica* and *Brassica oleracea* subsp. *capitata* using TDZ and NAA. Pakistan Journal of Botany 46: 329-335.

**Redig P, Shaul O, Inze D, Van Montagu M, Van Onckelen H** (1996) Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. FEBS Letters 391: 175-180.

**Renaudin JP, Doonan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inzé D, Jacobs, T, Kouchi H, Rouze P, Sauter M, Savoure A, Sorrell DA, Sundaresan V, Murray JAH** (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-cyclins based on sequence organisation. Plant Molecular Biology 32: 1003-1018.

**Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JAH** (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. Science 283: 1541-1544.

**Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JMS, Murray JAH** (2000) Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 20: 4513-4521.

**Rodriguez APM, Wetzstein HY** (1994) The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. *Plant Cell Reports* 13: 607-613.

**Rodríguez APM, Wetzstein HY** (1998) A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Protoplasma* 204: 71-83.

**Rosa EAS, Heaney RK, Fenwick GR, Portas CAM** (1997) Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews* 19: 99-125.

**Rosa YBCJ, Aizza LCB, Armanhi JSL, Dornelas MC** (2013) A Passiflora homolog of a D-type cyclin gene is differentially expressed in response to sucrose, auxin, and cytokinin *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 115: 233-242.

**Ružić DjV, Vujović TI** (2008) The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). *Horticultural Science* 35: 12-21.

**Sagare AP, Lee YL, Lin TC, Chen CC, Tsay HS** (2000) Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) – a medicinal plant. *Plant Science* 160: 139-147.

**Sakai H, Honma T, Aoyama T, Sato S, Kato T, Tabata S, Oka A** (2001) ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science* 294: 1519-1521.

**Sakakibara H, Takei K** (2002) Identification of cytokinin biosynthesis genes in *Arabidopsis*: a breakthrough for understanding the metabolic pathway and the regulation in higher plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 21: 17-23.

**Sakakibara H** (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. *Annual Review of Plant Biology* 57: 431-449.

**Sakano Y, Okada Y, Matsunaga A, Suwama T, Kaneko T, Ito K, Noguchi H, Abe I** (2004) Molecular cloning, expression and characterization of adenylate isopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus* L.). *Phytochemistry* 25: 2439-2446.

**Sarasan V, Roberts AV, Rout GR** (2001) Methyl laurate and 6-benzyladenine promote the germination of somatic embryos of hybrid rose. *Plant Cell Reports* 20: 183-186.

**Sauter M** (1997) Differential expression of a CAK (*cdc2*-activating kinase)-like protein kinase, cyclins, and *cdc2* genes from rice during the cell cycle and in response to gibberellin. *The Plant Journal* 11: 181-190.

**Schmitz RY, Skoog F, Playtis AJ, Leonard NJ** (1972) Cytokinins: synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin. *Plant Physiology* 50: 702-705.

**Schmülling T, Werner T, Riefler M, Krupková E, Bartrina y Manns I** (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research* 116: 241-252.

**Selman LW, Kulasegaram S** (1966) Development of the stem tuber in kohlrabi. *Journal of Experimental Botany* 18: 471-490.

**Senger S, Mock HP, Conrad U, Manteuffel R** (2001) Immunomodulation of ABA function affects early events in somatic embryo development. *Plant Cell Reports* 20: 112-120.

**Sharma KK, Thorpe TA** (1989) *In vitro* regeneration of shoot buds and plantlets from seedling root segments of *Brassica napus* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 18: 129-141.

**Sharma KK, Bhojwani SS, Thorpe TA** (1990) Factors affecting high frequency differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L.) Czern. *Plant Science* 66: 247-253.

**Sharma KK, Thorpe TA** (1990) *In vitro* propagation of mulberry (*Morus alba* L.) through nodal segments. *Scientia Horticulturae* 42: 307-320.

**Shetty P, Banu U, Kedilaya T, Patheja M** (2012) Characterization of peroxidase from *Brassica oleracea gongylodes* gives a lead for use of bromocresol purple as a novel substrate for peroxidase assay. *Journal of Biochemical Technology* 4: 502-507.

**Sieberer T, Hauser MT, Seifert GJ, Luschnig C** (2003) PROPORZ1, a putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation. *Current Biology* 13: 837-842.



**Singh S, Sawhney VK** (1992) Endogenous hormones in seeds, germination behaviour and early seedling characteristics in a normal and *ogura* cytoplasmic male sterile line of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* 43: 1497-1505.

**Skoog F, Miller CO** (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11: 118-131.

**Skoog F, Miller CO** (1965) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In: Bell E (ed.) *Molecular and Cellular Aspects of Development*. Harper and Row, New York, pp. 481-494.

**Smertenko A, Bozhkov PV** (2014) Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning. *Journal of Experimental Botany* 65: 1343-1360.

**Soni R, Carmichael JP, Shah ZH, Murray JAH** (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7: 85-103.

**Sorrell DA, Combettes B, Chaubet-Gigot N, Gigot C, Murray JAH** (1999) Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiology* 119: 343-351.

**Souza BM, Kraus JE, Enders L, Mercier H** (2003) Relationships between endogenous hormonal levels and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 733-739.

**Sparrow PAC, Townsend TM, Morgan CL, Dale PJ, Arthur AE, Irwin JA** (2004) Genetic analysis of *in vitro* shoot regeneration from cotyledonary petioles of *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1249-1255.

**Sretenović-Rajičić T, Ninković S, Vinterhalter B, Miljuš-Đukić J, Vinterhalter D** (2004) Introduction of resistance to herbicide Basta<sup>®</sup> in Savoy cabbage. *Biologia Plantarum* 48: 431-436.

**Sretenović-Rajičić T, Ninković S, Miljuš-Đukić J, Vinterhalter B, Vinterhalter D** (2006) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Brassica oleracea* var. *sabauda* and *B. oleracea* var. *capitata*. *Biologia Plantarum* 50: 525-530.

**Stirk WA, Novák O, Václavíková K, Tarkowski P, Strnad M, Van Staden J** (2008) Spatial and temporal changes in endogenous cytokinins in developing pea roots. *Planta* 227: 1279-1289.

**Stirk WA, Václavíková K, Novák O, Gajdošová S, Kotland O, Motyka V, Strnad M, Van Staden J** (2012) Involvement of *cis*-zeatin, dihydrozeatin, and aromatic cytokinins in germination and seedling establishment of maize, oats, and lucerne. *Journal of Plant Growth Regulation* 31: 392-405.

**Strnad M** (1997) The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* 101: 674-688.

**Su YH, Liu YB, Zhang XS** (2011) Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant* 4: 616-625.

**Sugimoto K, Jiao YL, Meyerowitz EM** (2010) Arabidopsis regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Developmental Cell* 18: 463-71.

**Sugiyama M** (1999) Organogenesis *in vitro*. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 61-64.

**Suri SS, Saini ARK, Ramawat KG** (2005) High frequency regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *European Journal of Horticultural Science* 70: 71-78.

**Suzuki T, Sakurai K, Imamura A, Nakamura A, Ueguchi C, Mizuno T** (2000) Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64: 2486-2489.

**Swarup R, Parry G, Graham N, Allen T, Bennett M** (2002) Auxin cross-talk: Integration of signalling pathways to control plant development. *Plant Molecular Biology* 49: 411-426.

**Takagi M, Yokota T, Murofushi N, Ota Y, Takahashi N** (1985) Fluctuation of endogenous cytokinin contents in rice during its life cycle—quantification of cytokinins by selected ion monitoring using deuterium-labelled internal standards. *Agricultural and Biological Chemistry* 49: 3271-3277.

**Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T** (2001a) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 276: 26405-26410.

**Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama T** (2001b) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology* 42: 85-93.

**Takei K, Takahashi T, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H** (2002) Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *Journal of Experimental Botany* 53: 971-977.

**Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaya T, Sakakibara H** (2004a) *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 45: 1053-1062.

**Takei K, Yamaya T, Sakakibara H** (2004b) *Arabidopsis CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *Journal of Biological Chemistry* 279: 41866-41872.

**Tarkowská D, Dolezal K, Tarkowski P, Ástot C, Holub J** (2003): Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus canadensis* leaves by LC-(+) ESIMS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum* 117: 579-590.

**Taya Y, Tanaka Y, Nishimura S** (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 271: 545-547.

**Teo W, Lakshmanan P, Kumar P, Goh CJ, Swarup S** (1997) Direct shoot formation and plant regeneration from cotyledon explants of rapid-cycling *Brassica rapa*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 33: 288-292.

**Teo W, Kumar PP, Goh CJ, Swarup S** (2001) The expression of *Brostm*, a *KNOTTED1*-like gene, marks the cell type and timing of *in vitro* shoot induction in *Brassica oleracea*. *Plant Molecular Biology* 46: 567-580.

**Thorpe TA** (1980) Organogenesis *in vitro*: structural, physiological, and biochemical aspects. *International review of cytology - Supplement* 11A: 71-111.

**Thorpe TA** (2000) Somatic embryogenesis: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *Korean Journal of Plant Tissue Culture* 27: 245-258.

**Thorpe TA** (2007) History of plant tissue culture *Molecular Biotechnology* 37: 169-180.

**To JPC, Deruère J, Maxwell BB, Morris VF, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ (2007)** Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *The Plant Cell* 19: 3901-3914.

**To JPC, Kieber JJ (2008)** Cytokinin signaling: two-components and more. *TRENDS in Plant Science* 13: 85-92.

**Toonen MAJ, Hendriks T, Schmidt EDL, Verhoeven HA, Scientia Horticulturae Van Kammen A, De Vries SC (1994)** Description of somatic-embryo forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* 194: 565-572.

**Turgut K, Barghchi M, Scott R (1998)** Efficient shoot regeneration and somatic embryogenesis from immature cotyledons of *Brassica napus* L. *Plant Breeding* 117: 503-504.

**Uddin J, Solaiman AHM, Hasanuzzaman M (2009)** plant characters and yield of kohlrabi (*Brassica oleraceae* var. *gongylodes*) as affected by different organic manures. *Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants* 1: 1-4.

**Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997)** Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell* 9: 1963-1971.

**Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ (1999)** Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *The Plant Journal* 19: 309-319.

**Umeda M, Umeda-Hara C, Yamaguchi M, Hashimoto J, Uchimiya H (1999)** Differential expression of genes for cyclin dependent protein kinases in rice plants. *Plant Physiology* 119: 31-40.

**Umeda U, Shimotohno A, Yamaguchi M (2005)** Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase activating kinases in plants. *Plant Cell Physiology* 46: 1437-1442.

**Valdés AE, Ordas RJ, Fernandez B, Centeno ML (2001)** Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 377-84.

**Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouze P, Rombauts S, Inzé D (2002)** Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 903-916.

**Van der Graaff EE, Auer CA, Hooykaas PJJ** (2001) Altered development of *Arabidopsis thaliana* carrying the *Agrobacterium tumefaciens ipt* gene is partially due to ethylene effects. *Plant Growth Regulation* 34: 305-315.

**Van Leene J, Hollunder J, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Stals H, Van Isterdael G, Verkest A, Neiryneck S, Buffel Y, De Bodt S, Maere S, Laukens K, Pharazyn A, Ferreira PC, Eloy N, Renne C, Meyer C, Faure JD, Steinbrenner J, Beynon J, Larkin JC, Van de Peer Y, Hilson P, Kuiper M, De Veylder L, Van Onckelen H, Inzé D, Witters E, De Jaeger G** (2010) Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology* 6: 1-10.

**Van Staden J, Crouch NR** (1996) Benzyladenine and derivatives – their significance and interconversion in plants. *Plant Growth Regulation* 19: 153-175.

**Vaughn SF, Berhow MA** (2005) Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. *Industrial Crops and Products* 21: 193-202.

**Vasic D, Alibert G, Skoric D** (2001) Protocols for efficient repetitive and secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Schrader). *Plant Cell Reports* 20: 121-125.

**Vasil IK** (2008) A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports* 27: 1423-1440.

**Vasil V, Lu C, Vasil IK** (1985) Histology of somatic embryogenesis in cultured embryos of maize (*Zea mays* L.). *Protoplasma* 127: 1-8.

**Veach YK, Martin RC, Mok DWS, Malbeck J, Vaňková R, Mok MC** (2003) O-Glucosylation of *cis*-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiology* 131: 1374-1380.

**Verdeil JL, Alemanno L, Niemenak N, Tranbarger TJ** (2007) Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in Plant Science* 12: 245-252.

**Verma SK, Yücesan BB, Şahin G, Gürel S, Gürel E** (2011) Direct shoot regeneration from leaf explants of *Digitalis lamarckii*, an endemic medicinal species. *Turkish Journal of Botany* 35: 689-695.

**Vinterhalter D, Sretenović-Rajičić T, Vinterhalter B, Ninković S** (2007) Genetic transformation of *Brassica oleracea* vegetables. *Transgenic Plant Journal* 1: 340-355.

**Vogel JP, Woeste KE, Theologis A, Kieber JJ** (1998) Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene *ACS5* of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 4766-4771.

**Vollbrecht E, Veit B, Sinha N, Hake S** (1991) The developmental gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* 350: 241-243.

**Von Arnold S, Clapham D, Egertsdotter U, Mo LH** (1996) Somatic embryogenesis in conifers – a case study of induction and development of somatic embryos in *Picea abies*. *Plant Growth Regulation* 20: 3-9.

**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.

**Wang G, Kong H, Sun Y, Zhang X, Zhang W, Altman N, De Pamphilis CW, Ma H** (2004) Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiology* 135: 1084-1099.

**Watanabe N, Yokota T, Takahashi N** (1981) Variations in the levels of *cis*- and *trans*-ribosylzeatins and other minor cytokinins during development and growth of cones of the hop plant. *Plant Cell Physiology* 22: 489-500.

**Weigel D, Jürgens G** (2002) Stem cells that make stems. *Nature* 415: 751-754.

**Werbrouck SPO, Strnad M, Van Onckelen H, Debergh PC** (1996) Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiologia Plantarum* 98: 291-297.

**Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T** (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98: 10487-10492.

**Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling T** (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell* 15: 2532-2550.

**Werner T, Köllmer I, Bartrina K, Holst K, Schmülling T** (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology* 8: 371-381.

**Whitty CD, Hall RH** (1974): A cytokinin oxidase in *Zea mays*. Canadian Journal of Biochemistry 52: 787-799.

**Williams EG, Maheswaran G** (1986) Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Annals of Botany 57: 443-462.

**Williams DJ, Pun S** (2011) Glucosinolates in *Brassica* vegetables: role in bitterness and hence significance. Food Australia 63: 407-412.

**Wong KW, Loh CS** (1988) *In vitro* regeneration of plantlets from root segments of *Brassica alboglabra* Bailey. Scientia Horticulturae (Amsterdam) 35:7-14.

**Yamada H, Suzuki T, Terada K, Takei K, Ishikawa K, Miwa K, Yamashino T, Mizuno T** (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. Plant Cell Physiology 42: 1017-1023.

**Yamaguchi M, Kato H, Yoshida S, Yamamura S, Uchimiya H, Umeda M** (2003) Control of *in vitro* organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 100: 8019-8023.

**Yanai O, Shani E, Doležal K, Tarkowski P, Sablowski R, Sandberg G, Samach A, Ori N** (2005) *Arabidopsis* KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. Current Biology 15: 1566-1571.

**Yancheva SD, Golubowicz S, Fisher E, Lev-Yadun S, Flaishman MA** (2003) Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple. Plant Science 165: 299-309.

**Yang DC, Choi YE** (2000) Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes* – mediated transformation of *Panax ginseng*. Plant Cell Reports 19: 491-496.

**Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Wang W** (2001) Hormonal changes in the grains of rice subjected to water stress during grain filling. Plant Physiol 127: 315–323.

**Yang JL, Seong ES, Kim MJ, Ghimire BK, Kang WH, Yu CY, Li CH** (2010) Direct somatic embryogenesis from pericycle cells of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) root explants. Plant Cell Tissue and Organ Culture 100: 49-58.

**Yuldashev R, Avalbaev A, Bezrukova M, Vysotskaya L, Khripach V, Shakirova F (2012)** Cytokinin oxidase is involved in the regulation of cytokinin content by 24-epibrassinolide in wheat seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 55: 1-6.

**Yunus MF, Aziz MA, Kadir MA, Rashid AA (2012)** In vitro propagation of *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger) *Scientia Horticulturae* 135: 145-150.

**Zeynali M, Maleki zanjani B, Amiri ME, Noruzian M, Aghajari SM (2010)** Influence of genotype and plant growth regulator on somatic embryogenesis in rapeseed (*Brassica napus* L.). *African Journal of Biotechnology* 9: 4050-4055.

**Zhang CG, Li W, Mao YF, Zhao DL, Dong W, Guo GQ (2005)** Endogenous hormonal levels in *Scutellaria baicalensis* calli induced by thidiazuron. *Russian Journal of Plant Physiology* 52: 345-351.

**Zhang K, Diederich L, John PCL (2005)** The cytokinin requirement for cell division in cultured *Nicotiana plumbaginifolia* cells can be satisfied by yeast Cdc25 protein tyrosine phosphatase. Implications for mechanisms of cytokinin response and plant development. *Plant Physiology* 137: 308-316.

**Zhang R, Zhang X, Wang J, Letham DS, McKinney SA, Higgins TJV (1995)** The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an *ipt* gene. *Planta* 196: 84-94.

**Zhang S, Williams-Carrier R, Jackson D, Lemaux PG (1998)** CDC2Zm and KN1 expression during adventitious shoot meristem formation from *in vitro*—proliferating axillary shoot meristems in maize and barley. *Planta* 204: 542-549.

**Zhang S, Lemaux PG (2004)** Molecular Analysis of *in vitro* shoot organogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23: 325-335.

**Zhang Y, Xu J, Han L, Wei W, Guan, Z, Cong L, Chai T (2006)** Efficient regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica juncea*. *Plant Molecular Biology Reporter* 24: 255a-255i.

**Zhao XY, Su YH, Cheng ZJ, Zhang XS (2008)** Cell fate switch during *in vitro* plant organogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 816-824.



**Zhao XY, Su YH, Zhang CL, Wang L, Li XG, Zhang XS** (2013). Differences in capacities of in vitro organ regeneration between two *Arabidopsis* ecotypes Wassilewskija and Columbia. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 112: 65-74.

**Zimmerman JL** (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5: 1411-1423.

**Zubko E, Adams CJ, Machaekova I, Malbeck J, Scollan C, Meyer P** (2002) Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *The Plant Journal* 29: 797-808.

**Zwack PJ, Rashotte AM** (2013) Cytokinin inhibition of leaf senescence *Plant Signaling and Behavior* 8: 7, e24737.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Tatjana M. Ćosić rođena je 24. januara 1980. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1998. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija, gde je diplomirala 2007. godine. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je iste godine u okviru studijskog programa Fiziologija i molekularna biologija biljaka. Od septembra 2008. godine Tatjana Ćosić zaposlena je kao istraživač pripravnik u Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković". U zvanje istraživač saradnik izabrana je maja 2011. godine.

U toku svog naučno-istraživačkog rada Tatjana Ćosić učestvovala je u realizaciji sledećih nacionalnih projekata: "Regulacija morfofenetskih procesa i sekundarnog metabolizma i genetičke transformacije biljaka u kulturi *in vitro*" (br. 143026B, u periodu od 2007–2010), "Primena i razvoj biotehnoloških postupaka u proizvodnji ukrasnih biljaka" (br. 23010TR, u periodu od 2008–2010) i "Biotehnologija *in vitro* – gajene, lekovite i ugrožene biljne vrste" (br. ON173015, u periodu od 2011. do danas). Tatjana Ćosić je do sada osvojila tri nagrade u vidu studentskih stipendija za učešće na međunarodnim kongresima iz oblasti biljne biologije i biotehnologije.

Od naučnih udruženja, Tatjana Ćosić je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije, Evropskog društva za biljnu biologiju (FESPB), Američkog društva za hortikulturene nauke (ASHS), kao i Međunarodne asocijacije za biljnu biotehnologiju (IAPB).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Татјана М. Ћосић \_\_\_\_\_

број уписа \_\_\_\_\_ EA070007 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Цитокининска хомеостаза и експресија гена укључених у контролу ћелијског циклуса током процеса регенерације келерабе (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*)

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, \_\_\_\_\_ 15.04.2015. \_\_\_\_\_



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Татјана М. Ћосић \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_ ЕА070007 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Физиологија и молекуларна биологија биљака \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Цитокининска хомеостаза и експресија гена укључених у контролу  
ћелијског циклуса током процеса регенерације келерабе (*Brassica oleracea* var.  
*gongylodes*) *in vitro*

Ментор \_\_\_\_\_ др Славица Нинковић \_\_\_\_\_

Потписани \_\_\_\_\_ Татјана М. Ћосић \_\_\_\_\_

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, \_\_\_\_\_ 15.04.2015. \_\_\_\_\_



### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Цитокининска хомеостаза и експресија гена укључених у контролу ћелијског циклуса током процеса регенерације келерабе (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*)

*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, \_\_\_\_\_ 15.04.2015. \_\_\_\_\_

Ђосић

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.