

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Svetlana M. Tošić

**FIZIOLOŠKI I BIOHEMIJSKI ASPEKTI
PROPAGACIJE ENDEMIČNIH VRSTA
Micromeria pulegium (Rochel) Benth. i
Micromeria croatica (Pers.) Schott *in vitro***

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Svetlana M. Tošić

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL
ASPECTS OF PROPAGATION IN
ENDEMIC SPECIES *Micromeria
pulegium* (Rochel) Benth. and
Micromeria croatica (Pers.) Schoot *in
vitro***

doctoral dissertation

Belgrade, 2015

KOMISIJA:

dr **Dragana Stojičić**, vanredni profesor,
Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet,
Departman za biologiju i ekologiju

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

dr **Vesna Stankov Jovanović**, vanredni profesor,
Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet,
Departman za hemiju

dr **Bojan Zlatković**, docent,
Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet,
Departman za biologiju i ekologiju

dr **Tijana Cvetić Antić**, docent,
Univerzitet u Beogradu,
Biološki fakultet

U Beogradu, datum odbrane _____

Doktorska disertacija urađena je u laboratorijama Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, u laboratorijama Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerziteta u Beogradu i u laboratorijama Katedre za botaniku Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Srdačno se zahvaljujem svojoj dragoj mentorki dr Dragani Stojičić na izboru i koncipiranju teme, neizmernoj podršci, poverenju, savetima, uloženom trudu, velikom angažovanju u realizaciji doktorske disertacije i prijateljskim savetima.

Najlepše se zahvaljujem dr Bojanu Zlatkoviću na predusretljivosti, razumevanju, savetima, uloženom trudu i vremenu, i prenetoj ljubavi ka nauci.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Dušici Janošević na strpljenju, velikoj pomoći, razumevanju i zalaganju u ostvarenju doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Vesni Stankov Joavanović i Mariji Ilić sa Departmana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, na stručnoj pomoći u analizi i prezentovanju rezultata hemijskog sastava biljnih ekstrakata.

Takođe, zahvalnost dugujem dr Tijani Cvetić Antić na podršci i savetima. Neizmernu zahvalnost dugujem dr Violeti Slavkovskoj na nesebičnoj pomoći, velikom razumevanju, dobronamernim sugestijama, stručnoj pomoći u analizi i prezentovanju rezultata etarskih ulja biljaka. Takođe, veliku zahvalnost dugujem dr Tatjani Mihajilev Krstev na angažovanju u realizaciji eksperimenta iz oblasti antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata, kao i na sugestijama i predusretljivosti u radu.

Hvala svim dragim kolegama sa Departmana za biologiju i ekologiju, na pruženoj pomoći i podršci.

Beskrajnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima, sestri i svojoj porodici na bezrezervnoj podršci i razumevanju. Naravno, zahvaljujem se Pavlu, Iliji i Konstansi čija je ljubav moja nepresušna inspiracija.

Fiziološki i biohemijski aspekti propagacije endemičnih vrsta *Micromeria pulegium* (Rochel) Benth. i *Micromeria croatica* (Pers.) Schott *in vitro*

REZIME

Biljke iz familije usnatica (Lamiaceae) pripadaju grupi jestivih, lekovitih ili aromatičnih biljaka koje se koriste u tradicionalnoj medicini, hortikulturi, hemijskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Retke, endemične i/ili ugrožene vrste familije Lamiaceae predstavljaju poseban izazov za proučavanje, prevashodno u cilju očuvanja specijskog diverziteta i njihovih populacija u prirodi, ali i zato što su izvor važnih bioaktivnih molekula raznovrsnog dejstva (antimikrobna, antvirusna, fungicidna, antioksidantna, citotoksična, alelohemijska, insekticidna aktivnost, itd.) i potencijalno široke primene.

Usled izrazite heterogenosti, predstavnici roda *Micromeria* su bili često predmet taksonomskih diskusija. Pripadnike sekcije *Pseudomelissa* gde spada i *M. pulegium*, nakon molekularno genetičkih analiza hloroplastne DNK, Brauchler (2005) premešta u rod *Clinopodium*. Ipak, u ovoj tezi je primenjen tradicionalni taksonomski koncept, predložen od strane Harley-a i sar. (2004), koji podržava homogenost roda *Micromeria*, pri čemu je sect. *Pseudomelissa* njegova sastavna jedinica. U skladu sa primenjenim sistemom dve istraživane vrste su klasifikovane u idividualne sekcije roda: *Micromeria* sect. *Micromeria* (*M. croatica*), odnosno *Micromeria* sect. *Pseudomelissa* (*M. pulegium*).

Micromeria pulegium predstavlja endemičnu vrstu Južnih Karpata u Rumuniji, sa enklavom u istočnoj Srbiji, a *Micromeria croatica* balkansku endemičnu vrstu čiji se areal vezuje pre svega za planinski venac Dinarida. Njihove prirodne populacije imaju mali broj jedinki i nastanjuju staništa koja su pod negativnim uticajem antropogenih faktora. Imajući u vidu značaj roda *Micromeria*, kao i činjenicu da su pomenute vrste retke i ugrožene, javila se potreba da se one gaje zarad očuvanja i istraživanja bez pritiska na prirodne populacije i bez remećenja prirodnog genofonda. Iz pomenutih razloga obe vrste roda *Micromeria* uvedene su kulturu biljnih tkiva *in vitro*.

U ovoj disertaciji vršeno je ispitivanje efekata regulatora rastenja na morfogenezu i produkciju etarskih ulja endemičnih vrsta *M. pulegium* i *M. croatica* *in*

vitro. Kultura *in vitro* *M. pulegium* uspostavljena je korišćenjem segmenata stabla sa nodusom i dva listića. Uslovi pod kojima se ostvaruje najbolje razviće eksplantata su bili sledeći: najveći broj pupoljaka formiran je na eksplantatima koji su rasli na MS hranljivoj podlozi sa 3 μ M BA. Dužina aksilarnih izdanaka bila je najveća na podlozi sa 0,3 μ M BA i 0,57 μ M IAA. Najveći prinos sveže i suve mase ostvaren je gajenjem izdanaka na podlozi sa 10 μ M BA. Ožiljavanje izdanaka bilo je uspešno na MS/2 hranljivoj podlozi sa 1 mg/L IAA. Dobljene biljke uspešno su se aklimatizovale i time je regeneracija biljaka *M. pulegium* bila potpuna.

Kultura *in vitro* *M. croatica* uspostavljena je aseptičnim isključivanjem semena, a zatim sa dobijenih biljaka su izolovani segmenti stabla sa nodusom i parom listića. Najveći broj pupoljaka formiran je na eksplantatima *M. croatica* gajenim na MS hranljivoj podlozi sa 0,3 μ M kinetina. Na istoj podlozi, dužina aksilarnih izdanaka je bila najveća i postignut je najveći prinos sveže mase izdanaka. Najbolji prinos suve mase imali su izdanci gajeni na MS podlozi sa 10 μ M BA i 0,57 μ M IAA. Ožiljavanje aksilarnih izdanaka bilo je uspešno na MS/2 hranljivoj podlozi sa 0,3 mg/L IAA. Uspešnom aklimatizacijom, postignuta je potpuna regeneracija *M. croatica*.

Kvantitativnom i kvalitativnom analizom biohemijskih parametara regenerisanih izdanaka vršeno je upoređenje sastava etarskih ulja biljaka iz prirode i *in vitro* gajenih izdanaka na MS hranljivoj podlozi bez fitohormona i podlozi na kojoj je dobijen najveći prinos biomase. To je za *M. pulegium* podloga sa 10 μ M BA, a za *M. croatica* podloga sa 0,3 μ M kinetina. U svim uljima *M. pulegium* dominiraju pulegon i menton. Pulegon je najzastupljeniji u ulju samoniklih biljaka, a menton u ulju poreklom od izdanaka gajenih na MS podlozi bez fitohormona. U ulju biljaka *M. croatica* iz prirode dominantne komponente su borneol, α -kadinen i β -vetivenen. U ulju izdanaka propagiranih *in vitro* na MS podlozi bez fitohormona dominantne komponente su borneol, geranial, *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol i β -vetivenen, a u ulju izdanaka gajenih na podlozi sa kinetinom dominantne komponente su geranial, *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol i α -kadinen.

Analiziran je hemijski sastav metanolnih, etil-acetatnih i heksanskih ekstrakata, biljaka iz prirode i izdanaka gajenih *in vitro* na MS podlozi bez prisustva fitohormona. U ekstraktima obe vrste *Micromeria* identifikovana su 53 jedinjenja, od kojih je 42,22%

zajedničko za ekstrakte *M. pulegium* iz prirode i kulture *in vitro*, odnosno 67,65% zajedničko za ekstrakte *M. croatica* iz prirode i kulture *in vitro*.

Analizom antioksidativnih i antimikrobnih svojstava metanolnih ekstrakata utvrđena je veća vrednost ukupne redukcijske moći, kao i sadržaja ukupnih polifenola kod izdanaka gajenih u uslovima *in vitro* (bez fitohormona) u odnosu na biljke iz prirode. Metanolni ekstrakti *M. pulegium* i *M. croatica* delovali su na sve testirane bakterijske sojeve, ali znatno slabije u odnosu na referentne antibiotike.

Ključne reči: *Micromeria pulegium*, *Micromeria croatica*, *in vitro*, BA, kinetin, auksini, trihome, etarska ulja, antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Fiziologija i molekularna biologija biljaka

UDK: [[582.929.4:631.532]:[582.929.4:581.526.65]]:[581.129+581.135.5.]

Physiological and biochemical aspects of propagation in endemic species *Micromeria pulegium* (Rochel) Benth. and *Micromeria croatica* (Pers.) Schott *in vitro*

Abstract

Plants from Lamiaceae family are prominent representatives of the edible, medicinal or aromatic herbs used in traditional medicine, horticulture, chemical, cosmetic and food industry. The rare, endemic and/or threatened species from family Lamiaceae pose a special challenge for studying, primarily in order to preserve species diversity and their populations in the wild, but also as they are source material for important bioactive molecules with diverse activity (antimicrobial, antiviral, fungicidal, antioxidant, cytotoxic, allelochemical, insecticidal and other types of activity) and potential broad spectrum of use.

Due to the pronounced heterogeneity, representatives of genus *Micromeria* used to be a common topic of taxonomic discussions. After the molecular-genetic analyses of chloroplast DNA, Brauchler (2005) has transferred the representatives of section *Pseudomelissa*, which includes *M. pulegium*, into the genus *Clinopodium*. However, this thesis is using the traditional taxonomic concept suggested by Harley *et al.* (2004), supporting the homogeneity of genus *Micromeria*, where sect. *Pseudomelissa* remains its integral unit. According to this system the two studied species were classified within the individual sections of the genus: *Micromeria* sect. *Micromeria* (*M. croatica*) and *Micromeria* sect. *Pseudomelissa* (*M. pulegium*).

Micromeria pulegium represents an endemic species of Southern Carpathians in Romania, with an enclave in Eastern Serbia, while *Micromeria croatica* is an endemic Balkan species primarily connected with the mountain chain of Dinarides. Their natural populations are characterized by a small number of individuals inhabiting habitats under the negative influence of anthropogenic factors. Due to the importance of genus *Micromeria* and the fact that these two species are rare and threatened, a need arose to grow them in captivity so they may be preserved and studied without additional pressure on natural populations and without disturbance of the natural gene pool. For these reasons both species of genus *Micromeria* were introduced in plant tissue culture *in vitro*.

This dissertation is focusing on studying the effects of growth regulators on morphogenesis and production of essential oils in endemic species *M. pulegium* and *M. croatica in vitro*.

Culture *in vitro* of *M. pulegium* was established by using stem segments with a node and two leaflets. The conditions providing the best development of explants were as following: the greatest number of buds was formed in explants grown on MS medium with 3 μM BA. The length of axillary stems was the greatest at the medium with 0.3 μM BA and 0.57 μM IAA. The greatest yield of fresh and dry biomass was recorded in stems grown on medium with 10 μM BA. The stems have successfully formed roots on MS/2 nutritive medium with 1 mg/L IAA. The new plants have acclimatized successfully and regeneration of *M. pulegium* was completed.

Culture *in vitro* of *M. croatica* was established by aseptic germination of seeds, and the resulting plants were used to isolate stem segments with a node and a pair of leaflets. The greatest number of buds, as well as the longest buds was formed on explants of *M. croatica* grown on MS nutritive medium with 0.3 μM kinetin. The highest yield of fresh biomass of stems was achieved on the same medium. The highest yield of dry mass was achieved by stems grown on MS medium with 10 μM BA and 0.57 μM IAA. The axillary shoots have successfully formed roots on MS/2 nutritive medium with 0.3 mg/L IAA. After the successful acclimatization the regeneration of *M. croatica* was complete.

Quantitative and qualitative analyses of biochemical parameters of regenerated stems were used for comparison of composition of essential oils in plants taken from nature and stems grown *in vitro* on MS nutritive medium without phytohormones and on the medium with the highest yield of biomass. For *M. pulegium* this was the medium with 10 μM BA, while for *M. croatica* it was the medium with 0.3 μM of kinetin. All oils of *M. pulegium* are dominated by pulegone and menthone. Pulegone has shown the highest levels in oil from plants collected in the wild, while menthone was most prominent in oil from stems grown on MS substrate without phytohormones. The oil of *M. croatica* taken from the wild was dominated by borneol, α -cadinene and β -vetivenen. The dominant components in oil of stems propagated *in vitro* on MS substrate without phytohormones were borneol, geranial, *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol and β -vetivenen, while in the oil from stems grown on substrate with kinetin the dominant components were geranial, *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol and α -cadinene.

Analysis was also performed on the chemical composition of methanol, ethyl-acetate and hexane extracts in plants collected in the wild and stems grown *in vitro* on MS medium without phytohormones. The extracts of both species of *Micromeria* included a total of 53 compounds, 42,22% were shared by extracts of *M. pulegium* in wild populations and culture *in vitro*, while 67,75% were shared by extracts of *M. croatica* in wild populations and culture *in vitro*.

The analysis of antioxidant and antimicrobial activity of methanol extracts has shown higher values of total reductive power as well as the content of total polyphenols in stems grown *in vitro* (without phytohormones) when compared to plants in the wild. The methanol extracts of *M. pulegium* and *M. croatica* have shown effect on all tested bacterial strains, but much weaker than the referent antibiotics.

Key words: *Micromeria pulegium*, *Micromeria croatica*, *in vitro*, BA, kinetin, auxins, trichome, essential oils, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Broader science field: Biology

Narrower science field: Physiology and Molecular biology of Plants

UDK: [[582.929.4:631.532]:[582.929.4:581.526.65]]:[581.129+581.135.5.]

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE VRSTA <i>M.pulegium</i> i <i>M.croatica</i>	3
1.2. SEKUNDARNI METABOLITI	7
1.2.1. Terpenoidi	8
1.2.2. Fenolna jedinjenja	9
1.3. ETARSKA ULJA.....	11
1.4. SEKUNDARNI METABOLITI RODA <i>Micromeria</i>	14
1.5. ETARSKA ULJA RODA <i>Micromeria</i>	16
1.6. ANTIMIKROBNI POTENCIJAL RODA <i>Micromeria</i>	20
1.7. PROPAGACIJA BILJAKA in vitro	21
1.7.1. Fitohormoni.....	23
1.8. PRODUKCIJA SEKUNDARNIH METABOLITA U KULTURI in vitro	25
2. CILJEVI.....	31
3. MATERIJAL I METODE.....	32
3.1. BILJNI MATERIJAL	32
3.2. POVRŠINSKA STERILIZACIJA BILNOG MATERIJALA.....	33
3.3. SASTAV HRANLJIVIH PODLOGA	33
3.3.1. Sastav hranljivih podloga za indukciju aksilarnih pupoljaka	35
3.3.2. Sastav hranljivih podloga za indukciju korenova	37
3.4. USLOVI GAJENJA KULTURE	38
3.5. AKLIMATIZACIJA KULTURA	38
3.6. MIKROSKOPSKA ANALIZA.....	39
3.6.1. Priprema biljnog materijala za skenirajuću elektronsku mikroskopiju	39
3.6.2. Priprema biljnog materijala za svetlosnu mikroskopiju	39
3.7. METODE ZA ANALIZU ETARSKIH ULJA.....	40
3.7.1. Izolacija etarskih ulja	40
3.7.2. Analiza sastava etarskih ulja.....	40
3.7.3. Identifikacija komponenti etarskih ulja	41
3.8. PRIPREMANJE EKSTRAKATA <i>Micromeria</i>	41
3.9. TEČNA HROMATOGRAFIJA SA MASENOM SPEKTROMETRIJOM VISOKE REZOLUCIJE	42

3.10. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA.....	43
3.10.1. DPPH metoda	43
3.10.2. ABTS metoda	44
3.10.3. Određivanje ukupne redukcijske moći primenom Fe(III) /Fe(II) sistema	44
3.10.4. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	44
3.10.5. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida.....	45
3.11. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA BILJNIH VRSTA RODA <i>Micromeria</i>	45
3.11.1. Bakterijski sojevi	45
3.11.2. Mikrodiluciona metoda	46
3.12. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	47
4. REZULTATI	48
4.1. PROPAGACIJA BILJAKA <i>M. pulegium</i> <i>in vitro</i>	48
4.1.1. Uspostavljanje kulture <i>in vitro</i> <i>M. pulegium</i>	48
4.1.2. Indukcija i rastenje aksilarnih pupoljaka <i>M. pulegium</i>	50
4.1.3. Ožiljavanje aksilarnih izdanaka <i>M. pulegium in vitro</i>	55
4.1.4. Aklimatizacija biljaka <i>M. pulegium</i>	59
4.2. PROPAGACIJA BILJAKA <i>M. croatica</i> <i>in vitro</i>	61
4.2.1. Uspostavljanje <i>in vitro</i> kulture <i>M. croatica</i>	61
4.2.2. Indukcija i rastenje aksilarnih pupoljaka <i>M. croatica</i>	61
4.2.3. Ožiljavanje aksilarnih izdanaka <i>M. croatica in vitro</i>	65
4.2.4. Aklimatizacija biljaka <i>M. croatica</i>	68
4.3. MIKROMORFOLOŠKA I HISTOCITOLOŠKA ANALIZA TRIHOMA LISTOVA <i>M. pulegium</i>	69
4.4. MIKROMORFOLOŠKA I HISTOCITOLOŠKA ANALIZA TRIHOMA LISTOVA <i>M. croatica</i>	77
4. 5. HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA <i>Micromeria</i>	81
4.5.1. Količina i hemijski sastav etarskih ulja <i>M. pulegium</i>	81
4.5.2. Količina i hemijski sastav etarskih ulja <i>M. croatica</i>	84
4.6. HEMIJSKA ANALIZA EKSTRAKATA <i>M. pulegium</i> i <i>M. croatica</i>	88
4.7. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA <i>M. pulegium</i> i <i>M. croatica</i>	97
4.8. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA <i>M. pulegium</i> i <i>M. croatica</i>	99
4.8.1. Antimikrobna aktivnost ekstrakata biljne vrste <i>Micromeria pulegium</i>	99
4.8.2. Antimikrobna aktivnost ekstrakata biljne vrste <i>Micromeria croatica</i>	100
5. DISKUSIJA	102
5.1. PROPAGACIJA <i>in vitro</i> VRSTA <i>M. pulegium</i> i <i>M. croatica</i>	102

5.2. MIKROMORFOLOŠKA I HISTOCITOLOŠKA ANALIZA TRIHOMA LISTOVA VRSTA <i>Micromeria</i>	114
5.3. HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA <i>Micromeria</i>	117
5.4. HEMIJSKA ANALIZA EKSTRAKATA <i>M. pulegium</i> i <i>M. croatica</i>	120
5.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA <i>Micromeria</i>	121
5.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA VRSTA RODA <i>Micromeria</i>	125
5.6.1. Antimikrobna aktivnost ekstrakata <i>M. pulegium</i> i <i>M. croatica</i>	125
6. ZAKLJUČCI	128
LITERATURA.....	130
BIOGRAFIJA AUTORA.....	164
Prilog 1 - Izjava o autorstvu doktorskog rada	
Prilog 2 - Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	
Prilog 3 - Izjava o korišćenju doktorskog rad	

SKRĆENICE

2,4-D - 2,4-dihlorfenoksi sirćetna kiselina

2*i*P - (N⁶-(2-izopentil) adenin)

ABA- abscisinska kiselina

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

BA - benzil adenin

BAP - 6-benzil aminopurin

BHT - butilovani hidroksitoluen

DMAPP - 3,3-dimetilalil-pirofosfat

DPPH- 2,2-difenil, 1-pikril hidrazil

ESI- elektrosprej jonizacija

FID - plameno jonizujući detektor

FPP - farnezil difosfat

GA - giberelna kiselina

GAE - galna kiselina

GC - gasna hromatografija

GC-MS - gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom

GFS - geranil difosfat sintaza

GPP - geranil difosfat

HEp2- humana epitelna ćelija karcinoma tip 2

IAA - indol-3-sirćetna kiselina

IBA - indol-3-buterna kiselina

IPP - izopentenil difosfat

KI - Kovačev indeks

Kin - kinetin

L-DOPA - (L-3,4-dihidroksifenilalanin)

LM - svetlosna mikroskopija

MBC - minimalna baktericidna koncentracija

MEP - metileritritol fosfatni biosintetski put

MHA - Mueller-Hinton agar

MHB - Muller-Hinton bujon

MIC - minimalna inhibitorna koncentracija

MS - Murashige i Skoog hranljiva podloga

MVA - mevalonatni biosintetski put

NAA - α -naftalen sirćetna kiselina

SE - suv ekstrakt

SEM - skenirajuća elektronska mikroskopija

SMU - suva masa uzorka

TDZ - thidiazuron

TTC - 2,3,5-trifenil tetrazolijumhlorida

1. UVOD

Biljke iz familije usnatica (Lamiaceae) od davnina predstavljaju predmet čovekovog interesovanja. Mnoge vrste ove familije pripadaju grupi jestivih, lekovitih ili aromatičnih biljaka i koriste se u tradicionalnoj medicini, hortikulturi, hemijskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Retke, endemične i/ili ugrožene vrste familije Lamiaceae predstavljaju poseban izazov za proučavanje, prevashodno u cilju očuvanja specijskog diverziteta i njihovih populacija u prirodi, ali i zato što su izvor važnih bioaktivnih molekula raznovrsnog dejstva (antimikrobna, antivirska, fungicidna, antioksidantna, citotoksična, alelohemijska, insekticidna aktivnost, itd.) i potencijalno široke primene.

U filogenetskom sistemu biljaka (Takhtajan, 2009) rod *Micromeria* Benth. zauzima sledeći položaj: klasa Magnoliopsida, red Lamiales, familija Lamiaceae, podfamilija *Nepetoideae*, tribus *Mentheae* i subtribus *Menthinae*. *Micromeria* predstavlja relativno raznovrstan i taksonomski jedan od najinteresantnijih rodova familije Lamiaceae. Bentham (1829) je prvi put definisao rod *Micromeria*, shvaćen u užem smislu, izdvajajući ga zajedno sa ostalim taksonima nivoa rodova (*Satureja*, *Melissa*) i sekcija iz agregata *Satureja sensu lato*. Naziv roda potiče od grčkih reči *micro*s (malo) i *meris* (deo), opisujući nizak rast i zbijenu, busenastu formu, a verovatno i srazmerno sitne listove i cvetove kod većeg broja predstavnika roda. Spada u red bogatijih rodova pomenute familije, obuhvatajući više od 70 vrsta svetske flore, uključujući i 21 vrstu prisutnu u flori Evropskog kontinenta (Chater i Guinea, 1972; Harley i sar., 2004).

Tokom perioda dužeg od stotinu godina rod *Micromeria* je predmet intenzivnih taksonomskih diskusija, ali i brojnih nedoumica po pitanju njegove taksonomske strukture, pa trpi određena sistematska izmeštanja. Klasifikacija na nivou roda *Micromeria* je različito predstavljena od strane brojnih autora. Na osnovu morfoloških i filogenetskih odnosa Boisser (1879) grupiše vrste roda *Micromeria* u tri sekcije: *Cymularia*, *Eumicromeria* i *Pseudomellisa*. Morales (1993), podržavajući taksonomsku individualnost roda *Micromeria*, izdvaja ukupno šest sekcija. Harley i sar. (2004) predlažu koncept infrageneričke podele na četiri sekcije: *Micromeria*, *Pineolentia* P. Perez, *Cymularia* Boiss. i *Pseudomelissa*. Konačno, Brauchler (2005) na osnovu analize

hloroplastnih DNK markera ukazuje na blisku povezanost sekcije *Pseudomelissa* sa rodom *Clinopodium* i premešta skoro sve taksone *Micromeria* sect. *Pseudomellisa* Benth. u *Clinopodium*.

Prateći stanovište Flore Evrope (Chater i Guinea, 1972), Flore SR Srbije (Diklić, 1974; Diklić & Nikolić, 1986) i monografski stav Šilića (1979) u ovoj tezi je primenjen tradicionalni taksonomski koncept, predložen od strane Harley-a i sar. (2004). Svi navedeni izvori podržavaju homogenost roda *Micromeria*, pri čemu je sect. *Pseudomelissa* njegova sastavna jedinica. U skladu sa primenjenim sistemom dve istraživane vrste su na bazi adekvane morfološke osobenosti klasifikovane u idividualne sekcije roda: *Micromeria* sect. *Micromeria* (*M. croatica*), odnosno *Micromeria* sect. *Pseudomelissa* (*M. pulegium*).

Od preko dvadeset vrsta roda *Micromeria* registrovanih u flori Evrope, skoro polovina nastanjuje područje Balkanskog poluostrva (Chater i Guinea, 1972) koje se, zajedno sa Mediteranskim područjem, izdvaja kao jedan od značajnijih centara taksonomskog diverziteta roda na teritoriji Evrope. U flori Srbije je zabeleženo 7 vrsta roda *Micromeria* (Diklić, 1974) koje se mogu klasifikovati u dve sekcije: *Micromeria* sect. *Micromeria* (***M. croatica***, *M. juliana*, *M. cristata* i *M. parviflora*) i sect. *Pseudomelissa* (*M. thymifolia*, *M. albanica* i ***M. pulegium***).

Rod *Micromeria* odlikuje relativno široko opšte rasprostranjenje. Njegovi predstavnici se sreću na prostoru od planinskog venca Himalaja i Indijskog podkontinenta do Makaronezijskog arhipelaga, odnosno od Evrope do Zapadne (tropske), Istočne i Južne Afrike i Madagaskara (Harley i sar., 2004; Brauchler, 2005). Sa druge strane, njegovi brojni taksoni se odlikuju malim arealima i pojavom lokalnog endemizma, ukazujući na izražen stepen diverzifikacije u okviru roda. Opisani su i primeri spontane hibridizacije filogenetski bliskih taksona roda *Micromeria*, ukoliko se javljaju zajedno na staništima u prirodi (Meimberg i sar., 2006).

Vrste roda *Micromeria* pripadaju različitim životnim formama, od jednogodišnjih, preko višegodišnjih zeljastih do polužbunastih i žbunastih predstavnika. Za većinu vrsta je karakteristična prijatna aroma koja potiče od prisustva žlezda sa etarskim uljem na listovima, granama, kao i u cvastima biljke. Većina vrsta je niskog rasta (20-130 cm), sa karakterističnim zbijenim, busenastim ili polužbunastim habitusom nadzemnog dela biljke.

1.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE VRSTA *M.pulegium* i *M.croatica*

Micromeria pulegium (Rochel) Benth [syn: *Calamintha pulegium* (Rochel) Rchb. f.; *Melissa pulegium* Rochel; *Satureja pulegium* (Rochel) Briq.]



Slika1. *Micromeria pulegium* (klisura Svrljiškog Timoka)

Micromeria pulegium je višegodišnja biljka visoka 30-50 (90) cm (Slika. 1). Izdanci biljke su brojni, stabljike uspravne, odrvenjene u donjem delu, sa korom koja se trakasto ljušti. One su nerazgranate ili slabo granate, prekrivene prostim, unatrag savijenim dlakama. Listovi srednjeg i donjeg dela stabljike su jajasti, rede okruglasti. Gornji listovi su sitniji, eliptični do lancetasti. Svi listovi su u bazi klinasti, na licu tamnozeleni, na naličju pepeljasto-zeleni sa brojnim tačkastim žlezdama, pokriveni kratkim oštrim dlakama. Listovi poseduju 3-5 izraženih, lučno savijenih bočnih nerava, duž oboda su tupo nazubljeni. Lisna drška je gusto kratko dlakava, 2-3 puta kraća od lisne ploče. Brakteje dlakave, ušiljeno-linearne, iste dužine kao cvetne drške ili kraće od

njih. Cvetovi sakupljeni u višecvetne, zbijene dihajizijume, 9-10 mm dugački. Čašica većinom uspravna, dugačka 4-5 mm, sa 13 izraženih, paralelnih nerava. Čašični zupci šiljasti, kraći od cevi, po rubu trepljavi, dva donja uzdužno dublje rasepana. U grotlu krunice, pri bazi čašičnih zubaca, formiran je prsten od prostih dlaka. Krunica bela, retko svetlo ljubičasta, sa ljubičastim pegama, spolja gusto pokrivena priljubljenim dlakama. Gornja usna ravna do blago konkavna, kraća od donje, purpurno istačkana. Orašice izdužene, svetlomrke, 0,8-1 mm dugačke, na vrhu sužene, tupo kljunaste, pri osnovi zaobljene, papilozne. Cveta od (VI) VII-IX meseca; (Šilić, 1979; Chater & Guinea 1972; Diklić & Nikolić, 1986).

Micromeria pulegium predstavlja endemičnu vrstu Južnih Karpata u Rumuniji, sa enklavom u istočnoj Srbiji. Biljka nastanjuje stenovita mesta, strme kamenjare i sipare, pri čemu se njena staništa nalaze uglavnom u krečnjačkim klisurama i kanjonima. Zabeležena je u visinskom dijapazonu od 1000-1200 m (Šilić, 1979), ali se sreće i na znatno manjim nadmorskim visinama. Literaturni izvori ukazuju da se *M. pulegium* osim u Rumuniji sreće i na manjem broju lokaliteta u istočnoj Bosni i zapadnoj Srbiji (Šilić, 1979; Diklić & Nikolić, 1986). Međutim, nakon revizije podataka o distribuciji vrste (Bogosavljević i sar., 2007) smatra se da je areal *M. pulegium* na Balkanskom poluostrvu daleko manji. Podaci o rasprostranjenju ove vrste u zapadnoj Srbiji i istočnoj Bosni se smatraju diskutabilnim i verovatno se odnose na hibridni takson $\times$ *Calamicromeria hostii*. Prisustvo vrste *M. pulegium* u Srbiji je za sada sa sigurnošću evidentirano jedino u njenom istočnom delu, u klisuri Svrljiškog Timoka kod Knjaževca (selo Orešac).

Micromeria croatica (Pers.) Schott [syn: *Satureja croatica* (Pers.) Briq.; *Thymus croaticus* Pers; *Micromeria piperella* Pancic ex Nyman; *Thymus subcordatus* Vis.]



Slika 2. *Micromeria croatica* (Mokra Gora)

Micromeria croatica je višegodišnja, busenasta biljka niskog rasta (Sika 2). Posедуje brojne, negranate ili slabo granate, u bazalnom delu delimično polegle, delimično odrvenele izdanke, visine od 5-25 (30) cm. Stabljika je na poprečnom preseku eliptična ili okrugla, sa tankom korom, obrasla stršećim dlakama. Pri osnovi je svetlo smeđe boje, naviše ljubičasto prevučena do sivozelena. Listovi su naspramni, sa 3-4 nerva, celog ili blago uvijenog oboda, skoro sedeći, 10-20 mm dugi, gusto raspoređeni, na vrhu ušiljeni, u bazi sa plitkom srcastom osnovom. Donji listovi stabla su ovalnog, srednji ovalnog do izduženo jajastog, a gornji eliptičnog ili jajastog oblika. Lice lisne ploče je tamno-zelena, dok je naličje svetlozelene do sivozelene boje. Pojedini listovi su ljubičasto prevučeni. Listovi sa obe strane poseduju manje ili više izražen dlakavi indumentum koji je naročito izražen u predelu nerava na naličju, kao i

retke uljane žlezde. Po 4-8 cvetova, sa dugačkim cvetnim drškama, su složeni u kratke dihajizume koji obrazuju pršljenove glavne cvasti. Čašica je svetlozelene do ljubičaste boje, pokrivena kratkim čekinjastim dlakama, sa 15 uzdužnih nerava. Čašični zupci lancetasti, uspravni, malo kraži od čašične cevi. Krunica je ljubičasto-purpurna, u donjem delu cevasta i 2 puta duža od čašične cevi. Plodići orašice, kestenjasto-smedje, 1,2-1,3 mm duge, valjkasto izdužene, na vrhu naglo kljunasto sužene. Cveti (VI) VII-VIII (IX) meseca; (Šilić, 1979; Diklić, 1974; Chater i Guinea, 1972).

Micromeria croatica predstavlja balkansku endemičnu vrstu čiji se areal vezuje pre svega za planinski venac Dinarida (Šilić, 1979). Nastanjuje pukotine krečnjačkih i krečnjačko-dolomitskih stena, kao i kamenjare, počev od preplaninskog do visokoplaninskog (alpskog) pojasa (Forenbacher, 1990). Prema Šiliću (1990) staništa ove vrste se prostiru u dijapazonu od 150 do preko 2000 m nadmorske visine. *M. croatica* je rasprostranjena u Hrvatskoj, Federaciji Bosne i Hercegovine, Crnoj Gori i Albaniji. Relativno malim delom svog areala *M. croatica* obuhvata i teritoriju zapadne Srbije, pri čemu je zabeležena kod sela Mokra Gora, u klisuri Belog Rzava (Hajdučka stena) kod sela Kotroman, na Zlatiboru, i na planini Tari (kanjon reke Grlac) i kod sela Zaovine (Biljeg, Vranjak) (Diklić, 1974; Nikolić i sar., 1986; Šilić, 1979). Prema florističkoj literaturi novijeg datuma (Nikolić i sar., 1986) na većini lokaliteta u Srbiji je prisustan takson *M. croatica* var. *panciciana* (Briq.) Hay., koji se od tipskog oblika razlikuje po izraženom prisustvu čekinjastih dlaka na stablu, listovima i čašicama i većim stablom.

U odnosu na geografski kriterijum, odnosno veličinu i poziciju njihovih areala, *M. pulegium* i *M. croatica*, predstavljaju endemične taksone, koji su svojim rasprostranjenjem (uključujući i disjunkciju *M. pulegium*) vezani za relativno mala geografska područja, što je u skladu sa definicijom endemizma (Janković, 1990). Na osnovu „Zakona o zaštiti prirode“ obe vrste u Srbiji uživaju zaštitu na nacionalnom nivou, i nalaze se na „Listi strogo zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva“ (Sl. gl. R. Srbije, br. 36/09). Takođe, oba taksona su kao potencijalno ugrožene vrste navedeni u „Preliminarnoj Crvenoj listi vaskularne flore Srbije i Crne Gore“ (Stevanović i sar., 2002).

Endemične, ugrožene i retke vrste, sa malim populacijama i staništima smeštenim u blizini urbanih središta česta su meta negativnog antropogenog delovanja.

Kako bi se očuvao biodiverzitet razvijaju se različite biotehnološke metode među kojima značajno mesto ima propagacija biljaka u kulturi *in vitro* (Sharma i Sharma, 2013; Paunescu, 2009; Reed i sar., 2011). Programe za konzervaciju biljaka u kojima bitnu ulogu imaju tehnike kulture *in vitro*, donose nacionalne i međunarodne organizacije uz opsežne genetske i ekološke studije (Fay, 1992).

1.2. SEKUNDARNI METABOLITI

Procesima primarnog metabolizma nastaju, transformišu se i razgrađuju primarni metaboliti: šećeri, aminokiseline, masne kiseline, nukleotidi, kao i njihovi polimeri (Nešković i sar., 2003). Metabolički procesi, tokom kojih nastaju jedinjenja koja naizgled nemaju jasno definisanu ulogu u biljnom organizmu predstavljaju sekundarni metabolizam, a nastala jedinjenja su sekundarni metaboliti (Kliebenstein i Osbourn, 2012).

Sekundarni metaboliti imaju veoma važnu ulogu u interakciji biljaka sa okruženjem delujući kao protektanti, repelenti, atraktanti ili alelopatski u odnosu na druge organizme (Hartmann, 1996; Li i sar 2010). Sekundarni metaboliti ulaze u sastav pojedinih složenih enzima, imaju hormonsku aktivnost, ispoljavaju antibiotsku, antioksidantnu, antifungalnu i antivirusnu aktivnost štiteći biljke od patogeni. Sa druge strane, pojedini sekundarni metaboliti biljaka ostvaruju blagotvorno i pozitivno dejstvo na zdravlje ljudi pa se nazivaju bioaktivnim jedinjenjima ili fitohemikalijama.

Sastav sekundarnih metabolita u biljkama varira između vrsta, ali i između jedinki jedne populacije, što je posledica delovanja sredinskih faktora. Kvalitativni, a posebno kvantitativni sastav sekundarnih metabolita kod biljaka variraju u zavisnosti od sezone, dok se među sredinskim faktorima naročito ističe uticaj vlažnosti i temperature (Mooney et al, 1975). Njihova akumulacija u tkivima biljka je u velikoj meri zavisna i od fiziološkog i razvojnog stadijuma (Oksman-Caldentey i Inze, 2004).

Do sada je otkriveno više od 100.000 produkata sekundarnog metabolizma biljaka (Ribera i Zuniga, 2012). Poznavanje distribucije sekundarnih metabolita je važno i čini osnovu hemotaksonomije i hemijske ekologije (Bourgaud, 2001). Sekundarni metaboliti nisu obilno zastupljeni u biljkama, i u njihov sastav ulazi manje od 1% ukupnog sadržaja ugljenika (Bourgaud, 2001). Oni se sa hemijskog aspekta

svrstavaju u različite grupe jedinjenja, zavisno od kriterijuma koji se koristi za njihovo klasifikovanje (Marin, 2003). To su relativno velike grupe molekula koje obuhvataju **terpenoide, fenole, steroide i alkaloid**e (Harborne, 1999; Bourgaud, 2001).

1.2.1. Terpenoidi

Terpenoidi su veoma rasprostranjena grupa sekundarnih metabolita, prisutni naročito kod aromatičnih biljaka. Do sada je izolovano preko 25.000 terpenoida (Baser i Demirci, 2007). Nazivaju se i izoprenoidima, jer su izgrađeni od izoprenske (2-metil-1,3-butadienske) C_5 jedinice (Ružička i sar., 1953). Zavisno od broja izoprenskih jedinica koje ih izgrađuju, terpenoidi se mogu podeliti na: monoterpenoide (dve izoprenske jedinice, C_{10}), seskviterpenoide (tri izoprenske jedinice, C_{15}), diterpenoide (četiri izoprenske jedinice, C_{20}), triterpenoide (šest izoprenskih jedinica, C_{30}), tetraterpenoide (osam izoprenskih jedinica, C_{40}) i politerpenoide (više od osam izoprenskih jedinica, $>C_{40}$) (Mahmoud i Croteau, 2002). Među njima, monoterpenoidi i seskviterpenoidi predstavljaju isparljive metabolite koji su odgovorni za miris biljaka (Marin, 2003).

Monoterpenoidi su strukturno vrlo raznovrsni. Dele se na aciklične (dve izoprenske C_5 jedinice povezane na način "*glava-rep*") i ciklične (monociklični, biciklični i triciklični). U odnosu na funkcionalne grupe mogu se klasifikovati u alkohole, aldehide, ketone, estre i druge grupe (Jančić i sar., 1995). U monoterpenoide spadaju i iridoidi čiji se skelet bazira na ciklopentan-[C]-piranu. Iridoidi su monoterpenski laktoni koji su prisutni u biljkama u vezanom obliku za šećere kao glikozidi, i kao takvi su neisparljivi. Imaju karakterističan gorak ukus (Marin, 2003). Monoterpenoidi imaju značajnu ekološku ulogu. Oni posreduju u interakciji između biljaka, privlače oprašivače, imaju antibakterijsku i antifungalnu aktivnost i štite biljke od herbivora (Marin, 2003; Croteau, 2000). To su važna antioksidativna jedinjenja koja sprečavaju lipidnu peroksidaciju (Takahashi i sar., 2003) i mogu sinergistički delovati sa drugim antioksidansima (Wagner i Elmadfa, 2003).

Seskviterpenoidi sadrže 15 C atoma i izgrađeni su od tri izoprenske jedinice. Kao i monoterpenoidi, dele se na aciklične i ciklične (monociklični, biciklični i triciklični). Svoju ekološku i fiziološku ulogu ostvaruju u biljkama delujući kao

feromoni, antifungalna jedinjenja i fitohormoni (ABA) (Zwenger i Basu, 2008; Nešković i sar., 2003).

U biljkama, diterpenoidi se najčešće sreću u vidu bicikličnih, tricikličnih i tetracikličnih jedinjenja. Pojedini diterpenoidi imaju važnu fiziološku ulogu jer predstavljaju komponente hlorofila (fitol) i fitohormona (GA).

Izopentenil pirofosfat (IPP) i 3,3-dimetilalil-pirofosfat (DMAPP) predstavljaju prekursore u biosintezi terpenoida. Oni su poreklom od dva prostorno odvojena biosintetska puta: citoplazmatičnog mevalonatnog puta (MVA) i plastidnog metileritritol fosfatnog puta (MEP) (Azmir i sar., 2013). U plastidima iz gliceraldehid-3-fosfata i piruvata nastaje IPP. U citoplazmi iz acetil-CoA nastaje IPP koji u prisustvu enzima IPP izomeraze, prelazi u DMAPP. Kondenzacijom IPP i DMAPP u prisustvu enzima geranil-difosfat sintaze (GFS) nastaje geranil-pirofosfat (GPP) sa 10 C-atoma, koji ima ključnu ulogu u biosintezi viših terpena. Procesom kondenzacije geranilpirofosfata (GPP) sa još jednim molekulom izopentenil-pirofosfata (IPP) u prisustvu enzima preniltransferaze nastaje farnezil-pirofosfat (FPP) sa 15 C atoma, koji je prekursor svih seskviterpena. Adicijom IPP na farnezil-pirofosfat (FPP) ili kondenzacijom dva molekula geranil-pirofosfata nastaje geranil-geranil-pirofosfat (GGPP) sa 20 C atoma koji je prkursor diterpena.

U brojnim biljnim vrstama sintetiše se više od hiljadu različitih diterpenoida koji su značajni u farmaceutskoj industriji (taksol) prehrambenoj (steviozid) i industriji parfema (Zerbe i Bohlmann, 2015).

1.2.2. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja sadrže bar jedan aromatičan prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. To su najviše rasprostranjeni sekundarni metaboliti u carstvu biljaka, koji obuhvataju: proste fenole (fenolne kiseline i kumarine) i polifenole (flavonoide i tanine) (Hurtado-Fernandez i sar., 2010). Postoji više podela fenolnih jedinjenja. Butler (1992), na osnovu broja ugljenikovih atoma vezanih za osnovni skelet fenola, deli fenolna jedinjenja na: proste fenole, fenilpropanoide, fenolne kiseline, flavonoide, stilbene, tanine, lignane i lignine.

Fenolne kiseline i flavonoidi su najviše istraženi. Fenolne kiseline koje su derivati benzoeeve kiseline, u biljkama se nalaze u slobodnom stanju, ili u obliku estra i glikozida. Fenolne kiseline koje su derivati cimetine kiseline, retko su u slobodnom stanju i imaju bolju antioksidativnu aktivnost od fenolnih kiselina koje su derivati benzoeeve kiseline. Zbog sposobnosti da inhibiraju lipidnu peroksidazu, fenolne kiseline se mogu koristiti kao konzervansi, antiinflamatorni agensi i antioksidansi (Kovačević, 2004). Poput većine fenola, fenolne kiseline nastaju iz acetata, biosintetskim putem preko šikimske kiseline (Robbins, 2003).

Metabolizam fenolnih jedinjenja obuhvata nekoliko povezanih metaboličkih puteva: glikolitički kada nastaje fosfoenolpiruvat, pentozo-fosfatni kada nastaje eritrozo-4-fosfat, put šikimske kiseline kada nastaju aromatične kiseline (fenilalanin, tirozin i triptofan) procese fenilpropanoidnog metabolizma kada nastaju derivati cimetine kiseline i lignin, i biosintetske puteve flavonoida (Cheynier i sar., 2013). U flavonoide spadaju: flavoni, izoflavoni, flavanoni, flavonoli, flavanoli, flavani, katehini, antocijanidini, leukoantocijanidini, halkoni, dihidrohalkoni i auron. Pojedini flavonoidi imaju važnu ulogu u formiranju boje cvetova i plodova biljaka (Harborne, 1994; Strack, 1997).

Fenolna jedinjenja veoma su zastupljena kod predstavnika familije Lamiaceae. Odlikuje ih visoka antioksidativna aktivnost jer imaju potencijal da "hvataju" slobodne radikale, kao i da heliraju metale. Različiti su mehanizmi oksidativnog delovanja fenolnih jedinjenja (Leopoldini i sar., 2011). U reakciji sa slobodnim radikalima, fenolna jedinjenja prenose vodonikov atom na slobodni radikal koji se stabilizuje zbog delokalizacije slobodnih elektrona i nastaju manje reaktivni fenoksi radikali (Wright i sar., 2001). Ukoliko prenose elektron na slobodni radikal, nastaju energetski stabilizovan anjon i aromatična struktura koja je stabilizovana delokalizovanim elektronima (Wright i sar., 2001). Fenolna jedinjenja mogu vezati za sebe metale, sprečavajući ih da učestvuju u reakcijama, tokom kojih nastaju slobodni radikali u biljnim tkivima (Jovanović i sar., 1998). Takođe, reagujući sa drugim antioksidativnim jedinjenjima, fenolna jedinjenja mogu doprineti antioksidativnoj aktivnosti (Fraga i sar., 2010; Perron i Brumaghim, 2009).

Različite grupe fenolnih jedinjenja imaju važnu ulogu u odbrambenim mehanizmima biljke. Kada se biljke nađu u stresnim uslovima (prekomerno UV

zračenje, oštećenje tkiva, infekcija) u njima se indukuje sinteza polifenolnih jedinjenja (Britton, 1983; Dixon i Paiva, 1995). Osim fiziološke i ekološke uloge, fenolna jedinjenja imaju i gradivnu ulogu u biljnim ćelijama.

Pored antioksidativne uloge, fenolna jedinjenja ispoljavaju antimikrobnu, antivirusnu, antiinflamatornu, antihepatotoksičnu i citotoksičnu aktivnost (Cuyckens i Claeys, 2004; Cowan 1999;), pa je razumljivo što postoji veliko interesovanje za njihovo proučavanje i korišćenje.

1.3. ETARSKA ULJA

Aromatične biljke kao i njihova etarska ulja čovek koristi od davnina u različite svrhe: za religiozne obrede, kao lekovita sredstva, u aromaterapiji i higijeni. Zahvaljujući svojoj antimikrobnoj, antifungalnoj i antioksidativnoj aktivnosti, etarska ulja imaju primenu u prehramenoj i farmaceutskoj industriji. Takođe se mogu koristiti kao herbicidi i pesticidi (Prins i sar., 2010).

Etarska ulja su kompleksne smeše hemijskih jedinjenja koja pripadaju različitim hemijskim klasama. U njihovom formiranju učestvuje najmanje pet grupa organskih jedinjenja: terpenoidi (monoterpeni i seskviterpeni), alifatična isparljiva jedinjenja, aromatična isparljiva jedinjenja, isparljive supstance koje sadrže azot i sumporna jedinjenja (izosulfocijanati i organski sulfidi) (Kitić 2006).

Hemijski sastav etarskih ulja je specifična karakteristika određene vrste ili varijeteta i genetski je uslovljen, te predstavlja hemijski "finger print" (otisak prsta) date vrste (Kovačević 2004). Hemijski sastav etarskih ulja je varijabilan i zavisi od mnogih faktora. Jedan od glavnih faktora koji utiče na produkciju i akumulaciju etarskih ulja je ontogenetski stadijum razvića biljke, organa ili tkiva (Sangwan i sar., 2001). Veza između ontogenetskog razvića listova i biosinteze i akumulacije ulja, evidentirana je kod brojnih aromatičnih biljnih vrsta: *Ocimum sanctum*, *Majorana hortensis*, *Cymbopogon flexuosus* (Sangwan i sar., 2001) i *Salvia officinalis* (Lakušić i sar., 2013a).

Na biosintezu etarskih ulja utiču i faktori sredine koji delujući na biohemijske puteve i fiziološke procese dovode do promena u metabolizmu biljaka (Sangwan i sar., 2001). Faktori koji utiču na količinu i sastav etarskih ulja su: fotoperiod, kvalitet

svetlosti, temperatura, sastav zemljišta, snabdevenost vodom, sezonske i klimatske promene (Lakušić i sar., 2011; 2012; 2013b; 2014). Tokom gajenja biljaka, različiti tretmani koji podrazumevaju upotrebu mineralnih soli i regulatora rastenja, mogu znatno uticati na prinos i kvalitet ulja (Sangwan i sar., 2001).

Etarska ulja učestvuju u metabolizmu biljke (fiziološka funkcija) i u interakciji biljke sa spoljašnjom sredinom (ekološka funkcija) utiču na rastenje i razviće biljaka kroz fiziološko i ekološko delovanje. Fiziološka funkcija etarskih ulja podrazumeva njihovu hormonsku ulogu, ulogu u održavanju respiratornih koenzima u redukovanoj formi i energetske ulogu. Etarska ulja su agensi biohemijske interakcije biljaka i spoljašnje sredine. Imaju ulogu u interakciji biljaka sa abiotičkim faktorima sredine, smanjuju temperaturu listova i povećavaju vlažnost vazduha u neposrednoj okolini listova, čime se smanjuje intenzitet transpiracije. Etarska ulja posreduju u interakciji biljaka sa biotičkim faktorima, što podrazumeva njihovu ulogu u alelopatskim i autopatskim odnosima, odnosu biljaka i životinja i odnosu biljaka, bakterija i gljiva (Jančić, 1995).

Etarska ulja se nalaze u sekretornim strukturama na različitim biljnim organima aromatičnih biljaka. Postoje dva tipa sekretornih struktura: spoljašnje i unutrašnje. U spoljašnje spadaju žlezdane dlake i osmore. Unutrašnje sekretorne strukture mogu biti organizovane kao uljne ćelije, sekretorne šupljine i sekretorni kanali.

Kod predstavnika familije Lamiaceae zastupljene su žlezdane dlake, tj. glandularne trihome. Glandularne trihome su mesto biosinteze, akumulacije i sekrecije različitih sekundarnih metabolita među kojima dominiraju etarska ulja (Werker i sar., 1985; Fahn 2000; Werker, 2000). Trihome se nalaze na površini vegetativnih i reproduktivnih organa. Nastale su od epidermalnih ćelija koje su okrenute ka spoljašnjoj sredini (Werker, 2000). Osim u epidermalnim trihomama, komponente etarskih ulja, prvenstveno terpeni, mogu se akumulirati i u specijalizovanim unutrašnjim ćelijama koje mogu biti raspoređene između palisadnih ćelija lista, ili ćelija kore stabla (Guo i sar., 2013).

Kao i kod većine predstavnika Lamiaceae, mikromorfološke studije analiziranih predstavnika roda *Micromeria* ukazuju na prisustvo dva tipa trihoma (Kremer i sar., 2014a; Kremer i sar., 2014b; Marin i sar., 2013). To su žlezdane (glandularne) i nežlezdane (neglandularne) trihome.

Žlezdane trihome se sastoje od bazalne ćelije epidermalnog porekla, drške i glave. Dršku čine jedna ili nekoliko nesekretornih ćelija, a glava se sastoji od jedne ili više sekretornih ćelija. Kod Lamiaceae zavisno od strukture sekretorne glave, Werker (1993) izdvaja dva tipa žlezdanih trihoma, peltatne (grč. *pelte* - štit, *peltatus* - štitolik) i kapitatne (lat. *capitatus*-glavičast). Oba tipa akumuliraju sekretorne komponente van ćelijskog zida u subkutikularni prostor, koji je kod peltatnih prostran, dijametra 40-60 µm, a kod kapitatnih trihoma je manji, globularni 10-30 µm (Luo i sar., 2010). Peltatne trihome imaju kratku jednoćelijsku dršku i široku glavu sastavljenu od više sekretornih ćelija raspoređenih u jedan ili dva koncentrična kruga. U vršnom delu zrele peltatne dlake smešten je subkutikularan prostor, nastao odvajanjem kutikule i kutikularnog sloja od ćelijskog zida glave. Kapitatne trihome imaju jednoćelijsku ili višećelijsku dršku i glavu izgrađenu od jedne ili dve ćelije. Za razliku od peltatnih, kapitatne trihome odlikuje varijabilnost u građi, veličini, obliku kao i načinu i intenzitetu sekrecije usled čega se izdvaja više podtipova (Werker i sar., 1985.)

Na površini žlezdanih dlaka je kutikularni sloj. Bočni zidovi ćelija drške su kutinizirani, što omogućava formiranje subkutikularnog prostora samo u gornjem delu žlezde. Na taj način sprečava se kretanje supstanci iz parenhima u sekretorne ćelije (Dell i McComb, 1977).

Bez obzira kom tipu da pripadaju žlezdane trihome imaju isto poreklo. Nastaju od jedne protodermalne ćelije (koja je veća od okolnih ćelija), sa gustom citoplazmom, relativno većim jedrom, brojnim organelama i zaobljenim ćelijskim zidom. Nakon prve perikline deobe slede različiti razvojni putevi koji će dovesti do formiranja različitih tipova trihoma (Jia i sar., 2012).

Sintezu etarskog ulja paralelno prati formiranje subkutikularnog prostora u koji se ulja premeštaju egzocitozom (Ascensao i Pais 1998; Gersbach, 2002). Različite organele učestvuju u produkciji i skladištenju ulja: plastidi, endoplazmatični retikulum (ER) i vakuole.

Izlučivanje supstanci iz glandularnih trihoma se dešava ekstracelularnom egzogenom sekrecijom merokrinog tipa. Peltatne trihome izlučuju lipofilne supstance a kapitatni mahom polisaharide i u manjoj meri etarska ulja (Huang i sar., 2008). Etarsko ulje nastalo u sekretornim ćelijama glave peltatne dlake prolaze kroz zidove i akumuliraju se u subkutikularnom prostoru, a nakon rupture kutikule oslobađaju se u

spoljašnju sredinu. Sekrecija kapitatnih dlaka dešava se kod mladih listova. Kod kapitatnih dlaka postoje tri načina sekrecije: preko pora u kutikuli, izlučivanjem u prostor nastao izdizanjem kutikule od sekretorne ćelije nakon čega kutikula puca, ili ređe formiranjem čašolikog subkutikularnog prostora gde se sakupljaju metaboliti koji po pucanju kutikule izlaze u spoljašnju sredinu. Sekrecija peltatnih dlaka počinje pošto je već završena sekrecija kapitatnih dlaka (Lakušić, 1995).

Zahvaljujući svojoj strukturi i hemijskoj prirodi metabolita koje sadrže, žlezdane trihome imaju brojne funkcije. Prisustvo različitih tipova dlaka, kao i razlika u njihovoj gustini na vegetativnim i reproduktivnim delovima upućuje na njihove različite biološke funkcije. Kod mnogih biljaka razviće trihoma je konstitutivno, dok se kod nekih vrsta povećava gustina trihoma na novonastalim listovima kao odgovor na oštećenja, praćena povećanom koncentracijom sekundarnih metabolita (Agrawal, 1999).

Trihomi imaju zaštitnu ulogu. Vremenski nesinhronizovana sekrecija trihoma izuzetno je važna za biljke jer im obezbeđuje zaštitu tokom ranog i kasnijeg stadijuma razvića. Trihome štite biljke od patogena i herbivora (Levin, 1973) jer su oslobođeni sekundarni metaboliti (monoterpeni, seskviterpeni, fenoli) potencijalno toksični ili repelentni za njih. Značajne su za otpornost na abiotički stres. Povećavaju tolerantnost na sušu redukujući absorpciju sunčevog zračenja, povećavajući refleksiju svetlosti i lisnu površinu. Štite od UV radijacije i ekstremnih temperaturnih vrednosti (Wagner, 1991; Werker, 2000; Benz i Martin, 2006; Fernández i sar., 2011). Sekundarni metaboliti trihoma ispoljavaju antibiotsku i antimikrobnu aktivnost. Komponente eksudata trihoma mogu imati ulogu u regulaciji rasteenja biljaka kao i svojstvo alelohemikalija (Wagner, 1991). Trihomi su važni u procesu oprašivanja biljaka kao i u drugim interakcijama biljaka i spoljne sredine (Mraz, 1998).

1.4. SEKUNDARNI METABOLITI RODA *Micromeria*

Predstavnike roda *Micromeria* odlikuje velika morfološka raznovrsnost i njihovo rasteenje i razviće je pod delovanjem različitih ekoloških faktora, što uslovljava veliku raznovrsnost njihovih sekundarnih metabolita. Prisustvo sekundarnih metabolita, pre svega flavonoida i terpena obezbeđuje raznovrsnost bioloških aktivnosti vrsta roda *Micromeria* (Vladimir-Knežević i sar., 2000).

U nadzemnim organima *M. croatica* prisutni su flavonoidi derivati kvercetina, apigenina i luteolina, kao i fenolne kiseline ruzmarinska i hlorogenska (Šamec 2011). Bival Štefan (2010) navodi da prisustvo hidroksicinamičnih kiselina (zabeležena je kod *M. croatica*, *M. juliana*, i *M. thymifolia*) doprinosi anti-inflamatornoj aktivnosti njihovih ekstrakata.

U strukturama koje se nalaze na površini listova vrsta roda *Micromeria* konstatovano je prisustvo sledećih sekundarnih metabolita: timonina, timusina, pebrelina, ladaneina, 5,6-dihidroksi-7,8,3',4'-tetrametoksiflavona i 5,6-dihidroksi-7,3',4'-trimetoksiflavona rastvorenih u terpenoidnom matriksu (Tomás-Barberán i sar., 1988). Od flavanona koji su česti u familiji Lamiaceae, naringenin je prisutan kod *Micromeria* i srodnih rodova (Bellino i sar., 1980). Flavanon glikozid neoponcirin prisutan je u rodu *Micromeria*, ali i kod srodnih vrsta iz rodova *Acinos* i *Calamintha* (Bellino i sar., 1980).

Marin (1996) navodi da flavonoidi mogu biti korisni taksonomski markeri za određivanje granica između blisko srodnih rodova: *Micromeria*, *Calamintha*, *Acinos*, *Satureja* i *Clinopodium*. Sa hemotaksonomskog aspekta on posebno izdvaja značaj acetilovanih flavononskih glikozida (Marin 2001; Marin 1996). Sličan sastav, pre svega, površinskih flavonoida i akumulacija 5,6-dihidroksi-7,8-dimetoksiflavona izdvaja rodove iz tribusa Mentheae (*Micromeria*, *Acinos*, *Calamintha*, *Origanum*, *Thymus*, *Mentha* i *Satureja*) od ostalih rodova familije Lamiaceae (Thomas-Barberán i sar., 1988; Thomas-Barberán i Gill., 1992). Rezultati istraživanja vakuolarnih flavonoida *Micromeria*, među kojima dominiraju derivati luteolina, podržavaju Boisser-ovu klasifikaciju *Micromeria* (1879) na sekcije *Pseudomelissa* i *Eumicromeria*. Predstavnici sekcije *Pseudomelissa* imaju uniformnije morfološke odlike kao i profil flavonoida za razliku od sekcije *Eumicromeria* koja je za oba svojstva heterogenija (Marin 1996).

1.5. ETARSKA ULJA RODA *Micromeria*

Do sada je analiziran hemijski sastav većeg broja vrsta roda *Micromeria* (Tab. 1). Pulegon, izomenton, menton, limonen, linalol, α -pinen, β -pinen, p -cimen, γ -terpinen, α -terpineol, kamfen, β -burbonen i borneol su komponente koje najčešće ulaze u sastav etarskih ulja biljnih vrsta ovog roda (Duru i sar., 2004).

Kada se uporedi hemijski sastav ulja različitih predstavnika roda *Micromeria*, može se primetiti da su kvalitativne i kvantitativne razlike ulja manje između vrsta iste sekcije, a veće između vrsta različitih sekcija. Veća je varijabilnost u sastavu ulja nego sadržaju, i varijabilnost je manje izražena kod vrsta sekcije *Pseudomelissa*. Predstavnici sekcije *Pseudomelissa* imaju količinu ulja preko 0,5%. Različiti oksidovani monoterpeni mentanskog tipa dominiraju u uljima. Hetrogenost je izraženija u sekciji *Micromeria* i prinos ulja je manji od 0,5%, a dominantne komponente su seskviterpeni, a među njima kariofilen oksid i spatulenol (Slavkovska i sar., 2005).

Hemijski sastav etarskih ulja nekoliko vrsta sekcije *Pseudomelissa*: *M. fruticosa* (Dudai i sar., 2001), *M. thymifolia* (Vladimir-Knežević i sar., 2000) i *M. pulegium* (Slavkovska i sar., 2013) varira sezonski i različit je u različitim fenofazama.

Etarska ulja vrsta *Micromeria* ispoljavaju antifungalnu (Marinković i sar., 2003 Abou-Jawdah i sar., 2004, Ozcan 1999), antifitovirusnu (Bežić i sar., 2013) kao i alelohemijsku (Dudai i sar., 2009) aktivnost.

Tabela 1. Hemijski sastav etarskih ulja vrsta roda *Micromeria*

Vrste sekcije <i>Pseudomelissa</i>	Glavne komponente %	Literatura
<i>M. albanica</i>	Piperiton oksid 36,9 Piperitenon oksid 21,9 Piperitenon 10 Pulegon 7,8 Limonen 7	Slavkovska i sar., 2005.
<i>M. albanica</i>	Piperiton oksid 38,73 Pulegon 13,43 Piperitenon 9,72 Piperiton 5,62	Marinković i sar., 2003.
<i>M. cilicica</i>	Pulegon 66,55 <i>cis-p</i> -Menton (sin. izomenton) 21,71 <i>trans-p</i> -Menton (sin. menton) 9,59	Duru i sar., 2004.
<i>M. dalmatica</i>	Piperitenon 56,7 Pulegon 12,1	Slavkovska i sar., 2005.

	Limonen 8,3	
<i>M. dalmatica</i>	Menton 10,23 Pulegon 34,79	Stojković i sar., 1987
<i>M. dalmatica</i>	Pulegon 29,6 Menton 11,7 Piperitenon 10,8	Radulović i Blagojević 2012.
<i>M. dolichodontha</i>	Izomenton 23,5 Pulegon 14,9	Baser i sar., 1997 b.
<i>M. fruticosa</i>	Pulegon 59,7 Izomentol 11,5 β -Kariofilen 5,1	Dudai i sar., 1999.
<i>M. fruticosa</i>	Pulegon >56 Izomenton >15 Piperitenon >7	Arslan, 2012.
<i>M. fruticosa</i> subsp. <i>serpyllifolia</i>	Linalol 30,29 Pulegon 16,65 <i>p</i> -Menton (sin. menton) 10,27	Telci i Ceylan, 2007.
<i>M. fruticosa</i> subsp. <i>brachycalyx</i>	Linalol 39,92 Piperitenon 31,93 Pulegon 9,47	Telci i Ceylan, 2007.
<i>M. fruticosa</i> (L.) Druce subsp. <i>serpyllifolia</i> (Bieb.)	Pulegon 33,4 Piperitenon 33,1	Kirimer i sar., 1993 a.
<i>M. fruticosa</i> (L.) Druce subsp. <i>barbata</i> (Boiss & Kotschy)	Pulegon 81,29	Kirimer i sar., 1993b.
<i>M. fruticosa</i> (L.) Druce subsp. <i>giresunica</i>	Pulegon 39,57 Mentol 24,27 Menton 24,21	Baser i sar., 1996.
<i>M. fruticosa</i> ssp <i>serpyllifolia</i>	Piperitenon 50,61 Pulegon 29,19	Gulluce i sar., 2004.
<i>M. brownei</i> (Swartz) Benth. var. <i>pilosiuscula</i>	Pulegon 51,69 Menton 20,88 Neomentol 11,87	Tucker i sar., 1992.
<i>M. libanotica</i>	Izomenton 44,5 Pulegon 13,5 Izopulegon 6,5	Diab i sar., 2005.
<i>M. pulegium</i>	Izomenton 27,2 Piperiton oksid 7,4 Limonen 6,8 <i>Cis</i> -Sabinen hidrat 6,4	Slavkovska i sar., 2005.
<i>M. pulegium</i>	Pulegon 18,4 - 76,1 Menton 7,5-65,3 Piperitenon 0,6-6,3 Piperiton 0,5-4,5	Slavkovska i sar., 2013.
<i>M. rupestris</i> L.	Menton 1,3 Pulegon 24,5 α -Terpinol 89,92	Agha i Khaiat, 2008
<i>M. thymifolia</i>	Piperiton oksid 1,8-63,8 Pulegon 6,2-72,3 Piperitenon 0,4-28,7 Piperiton 0,9-24,0 Limonen 3,0-11,7	Slavkovska i sar., 2005.

	Piperitenon oksid 0,9-16	
<i>M. nubigena</i> H.B.K	Timol 36,9 Karvakrol 16,7 Pulegon 10,8 Kariofilen oksid 4,6 (<i>E</i>)- Fitol 3,2	El-Seedi i sar., 2008.
Vrste sekcije <i>Micromeria</i>	Glavne komponente %	Literatura
<i>M. biflora</i>	Kariofilen oksid 42,5 β -Eudezmol 9,3% epi- α -Kadinol 5,7% β - Kariofilen 4,9	Chandra i sar., 2013.
<i>M. biflora</i>	Neral 25,3-32,2 Geranial 26,7-41,3	Mallavarapu i sar., 1997.
<i>M. biflora</i> subsp. <i>arabica</i>	β -Kariofilen 43,7 Kariofilen oksid 18,0 Spatulenol 8,5 α -Humulen 4,6	Al-Rehaily, 2006.
<i>M. carminea</i>	Borneol 26,02	Baser i sar., 1995.
<i>M. cristata</i> susp. <i>cristata</i>	Borneol 23,2 γ -Murolol 17,2 Kamfor 12,4	Carikci, 2013.
<i>M. cristata</i> subsp. <i>phrygia</i>	Borneol 35,3 Kamfor 13,5 Spatulenol 10,7	Carikci, 2013.
<i>M. cristata</i> subsp. <i>phrygia</i>	Borneol 27,39 Kamfor 9-15 Kariofilen oksid 4-6	Tabanaca i sar., 2001.
<i>M. cristata</i> subsp. <i>orientalis</i>	Borneol 33,7 α -Kadinol 13,0 Kamfor 9,8	Carikci, 2013.
<i>M. cristata</i>	Spatulenol 11,7 Kamfor 7,5 Globulol 6 Borneol 5,7 1,8 Cineol 5,0	Slavkovska i sar., 2005.
<i>M. cristata</i>	Izoborneol 11,3 Borneol 8,5	Stojanović i sar., 2006.
<i>M. croatica</i>	Kariofilen oksid 24,4 γ -Kadinen 10,9 Borneol 10,8 α -Murolol 8,1	Slavkovska i sar., 2005.
<i>M. croatica</i>	Linalol 2,6-5,9 Limonen 4,2-6,5 β -Kariofilen 24,5-5,7 Kariofilen oksid 10,9-22,3	Kremer i sar., 2012 b.
<i>M. cremnophila</i> Boiss. et Heldr. subsp. <i>amana</i>	Germakren D 24 β - kariofilen 23	Baser i sar., 1997 a.
<i>M. fruticulosa</i>	γ -Terpinen 14,5 β - Kariofilen 12,6 <i>p</i> -Cimen 8,9 α -Pinen 8,2 β - Bisabolen 7,2	Formisano i sar., 2007.

<i>M. teneriffae</i>	α -Pinen 20,3 Borneol 14,9 Nerolidol 10,9	Lawrence 1989
<i>M. graeca</i>	Kariofilen oksid 17 epi- α -Bisabolol 12,8 Linalol 18,1 β -Hamigren 12,5	Tzakou i Couladis, 2001.
<i>M. juliana</i>	β - Kariofilen 58,8 Kariofilen oksid 9,4 Pulegon 8,6	Carikci, 2013.
<i>M. juliana</i>	Kariofilen oksid 15,9-20,4 Karvakrol 18,1 <i>o</i> -Cimen 10,8 Izomenton 10,1	Slavkovska i sar., 2005.
<i>M. juliana</i>	Verbenol 11,8 Timol 10,8 Kariofilen oksid 10,5	Stojanović i sar., 2006.
<i>M. juliana</i>	Borneol 9,3 Izomer verbenol 8,7 Furanoid linalol oksid 6,5	Palić i sar., 2010.
<i>M. kosaninii</i>	Borneol 8,2 Izomer verbenol 11,7 Furanoid linalol oksid 9,8	Palić i sar., 2010.
<i>M. myrtifolia</i>	Kariofilen oksid 33,9 β - kariofilen 32,0 γ -Murulen 8,4	Carikci, 2013.
<i>M. parviflora</i>	<i>p</i> -Cimen 11.5- 14,6 Linalol 2-14,3 Spatulenol 12 Karvakrol 10,6	Slavkovska i sar., 2005.
<i>M. parviflora</i>	Spatulenol 29,9	Palić i sar., 2010.
<i>M. persica</i>	Linalol 15,2 α -Pinen 15,0 (E)-Nerolidol 13,8 Kariofilen oksid 9,8	Masoudi i sar., 2009.
<i>M. persica</i>	Timol 33,1.28,6 γ -Terpinen 28,7-17,5 Limonen 5,0-20,7 1,8-Cineol 14,2-0,2 <i>p</i> -Cimen 7,0-17,5	Sefidkon i Kalvandi, 2005.
<i>M. pseudocroatica</i>	Borneol 22,7-24,8 Kamfor 16,1-13,9	Kremer i sar., 2012 a.
<i>M. varia</i> Benth. ssp. <i>thymoides</i> (Sol. ex Lowe) Pérez var. <i>thymoides</i>	α -Pinen 20-35 Geranial 16 <i>trans</i> -Nerolidol 15 β - Kariofilen epoksid 12 β - kariofilen 10	Pedro i sar., 2006

1.6. ANTIMIKROBNI POTENCIJAL RODA *Micromeria*

Među biljkama koje poseduju antimikrobnu aktivnost izdvajaju se biljne vrste familije Lamiaceae, čiji različiti rodovi, uključujući i rod *Micromeria*, imaju zapaženo antimikrobno delovanje (Sarac and Ugur, 2007). Vrste roda *Micromeria* su aromatične biljke koje se tradicionalno koriste kao začini i u alternativnoj medicini kao sredstva za lečenje prehlade, abdominalnih bolova, očnih infekcija, visokog krvnog pritiska i srčanih tegoba (Al-Hamwi i sar., 2011; Dudai i sar., 2001; Telci i Ceylan., 2007). Koriste se i protiv bolova u grudima, za lečenje glavobolje, kožnih infekcija, kamena u bubregu, rana, a takođe i kao anestetik kod zubobolje, ili za lečenje čira i gljivičnih infekcija (Carikci 2013).

Zbog upotrebne vrednosti vrsta roda *Micromeria*, pažnja naučne javnosti bila je fokusirana na ispitivanje hemijskog sastava i antimikrobne aktivnosti njihovih etarskih ulja i u manjoj meri ekstrakata. Njihova antimikrobna svojstva uglavnom su zasnovana na sekundarnim metabolitima, fenolnim jedinjenjima, flavonima i flavonoidima, terpenoidima i alkaloidima (Cowan i sar., 1999; Cosentino i sar., 1999).

Nosioci antimikrobne aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja biljaka roda *Micromeria* uglavnom su njihova dominantna jedinjenja. Antimikrobnoj aktivnosti doprinose i manje zastupljena jedinjenja, svojim sinergističkim delovanjem. Sekundarni metaboliti različitim mehanizama ostvaruju antimikrobnu aktivnost.

Fenolna jedinjenja mogu indukovati lezije na citoplazmatskoj membrani, čime se narušava njena polupropustljivost. To ima za posledicu promenu membranskog potencijala, intracelularne pH vrednosti i dešava se efluks Na^+ jona (Nguefack i sar., 2004). Pojedine komponente etarskih ulja utiču na transport kroz proteinske membranske kanale (Knobloch i sar., 1989). Ostali mehanizmi delovanja su inhibicija sinteze nukleinskih kiselina, proteina i polisaharida bakterijskih ćelija, a samim tim i inhibicija njihovog rastanja i razvika (Himejima i sar., 1993). Sekundarni metaboliti mogu inhibirati ili potpuno sprečiti produkciju toksina (Smith-Palmer i sar., 2004).

Antimikrobna aktivnost zabeležena je kod različitih vrsta roda *Micromeria*: *M. cristata* (Tabanca i sar., 2001; Stojanović i sar., 2008), *M. thymifolia*, *M. albanica* i *M. dalmatica* (Marinković i sar., 2002), *M. fruticulosa* (Gulluce et al., 2004; Formisano i sar., 2007), *M. juliana* (Stojanović i sar., 2006), *M. biflora* (Al-Rehaily, 2006; Mishra i sar., 2010), *M. nubigena* (El-Seedi i sar., 2008), *M. congesta* (Herken i sar., 2012), *M.*

rupestris (Agha and Khaiat, 2008) i *M. barbata* (Bakkour i sar., 2012). Za testiranje antimikrobne aktivnosti *Micromeria* korišćeni su različiti sojevi Gram - pozitivnih i Gram - negativnih bakterija. U uslovima oslabljenog imuniteta, one izazivaju razna oboljenja: enteritis, infekcije urinarnog trakta, septikemiju, meningitis i pneumoniju (*Escherichia coli*). Patogeni sojevi uzrokuju različite bolesti kao što su salmoneloze (sve vrste roda *Salmonella*), intoksikacije (*Staphylococcus aureus*), listerioza (*Listeria monocytogenes*) i mnoštvo različitih infekcija.

1.7. PROPAGACIJA BILJAKA *in vitro*

Skup tehnika kojima se gaje ćelije, tkiva i organi u sterilnim i strogo kontrolisanim fizičkim i hemijskim uslovima, naziva se kultura biljnih ćelija, tkiva i organa *in vitro*. Procesima vegetativnog razmnožavanja u kulturi *in vitro*, za kratko vreme može se dobiti veliki broj genetički uniformnih jedinki određene biljne vrste, koje potiču od malog fragmenta roditeljske biljke. Otkriće da se biljke mogu brže klonirati u uslovima *in vitro* nego *in vivo*, ubrzalo je razvoj metoda vegetativnog razmnožavanja *in vitro* i doprinelo gajenju sve većeg broja vrsta na taj način.

U osnovi kulture biljnih ćelija i tkiva je teorija totopotentnosti i plastičnosti ćelija. Totipotentnost ćelija podrazumeva njihovu autonomnost i sposobnost da se dediferenciraju i regenerišu pojedine organe, embrione ili obrazuju kompletan biljni organizam *in vitro*. Plastičnost se ispoljava kroz sposobnost ćelija da promene svoj metabolizam, rastenje i razviće (Thorpe, 2007).

Postoji više načina vegetativne propagacije *in vitro*: mikropropagacija (permanentna kultura pupoljaka), organogeneza (*de novo* nastajanje pupoljaka i korenova, direktno, ili indirektno nakon obrazovanja kalusa), somatska embriogeneza (razviće embriona iz somatskih ćelija), androgeneza i ginogeneza (razviće biljaka bez oplodjenja iz haploidnih ćelija muškog i ženskog gametofita) i somatska hibridizacija (razviće biljnog organizma nakon fuzije somatskih ćelija koje se mogu ponašati kao polne ćelije) (Nešković i sar., 2003).

Pojedinačne ćelije, odsecci tkiva ili organa od kojih se inicira *in vitro* kultura nazivaju su eksplantatima. Zavisno od porekla eksplantata, postoje različiti tipovi kultura: kultura intaktnih biljaka, kultura embriona, kultura organa, kultura kalusa,

kultura pojedinačnih ćelija. Izbor eksplantata za uspostavljanje kulture *in vitro*, zavisi od izabranog tipa kulture, što je u funkciji biljne vrste i cilja koji se želi postići gajenjem *in vitro*. Iako se međusobno razlikuju, svi tipovi kulture realizuju se kroz nekoliko faza. To su faza inicijacije, multiplikacije, ožiljavanja i aklimatizacije.

Suština inicijalne faze je da se postigne aseptično rastenje i razvije eksplantata, čime se obezbeđuje izvorni materijal za sledeću fazu, multiplikaciju. Multiplikacija je faza umnožavanja koja ima za cilj da se ostvari reprodukcija bez gubitka genetičke stabilnosti (Marić, 1995). Da bi se postigao zadovoljavajući potencijal nastanka novih izdanaka, podloga za multiplikaciju najčešće sadrži citokinin i auksin niske koncentracije. Niska koncentracija auksina doprinosi boljem izduživanju izdanaka, uz malu incidencu kalusa na eksplantatima. Faza ožiljavanja je važna jer se biljke pripremaju da napuste uslove u kojima su rasle kao heterotrofne ili miksotrofne i prilagode se autotrofnom režimu ishrane. Kod nekih vrsta, ožiljavanje izdanaka spontano se dešava na podlozi koja se koristi u fazi multiplikacije. Češće, regeneracija korenovog sistema zahteva prisustvo hormona u podlozi (Moncousin, 1991). Podloge za ožiljavanje karakterišu veće koncentracije auksina, odsustvo citokinina, a ponekad i redukovane koncentracije mineralnih materija. *In vitro* uslovi mogu rezultirati nastankom "abnormalnih" biljaka koje imaju modifikovane morfo-anatomske i fiziološke osobine kao i oskudne vaskularne veze između izdanaka i korena što otežava prilagođavanje *ex vitro* uslovima (Hazarika, 2003). Tokom aklimatizacije, biljke poprimaju nove morfološke i anatomske odlike čime uspostavljaju tipičan vodni režim i autotrofnost. Listovi postaju deblji i povećava se njihova površina. Mezofil se bolje diferencira u višeslojno palisadno i sunđerasto tkivo sa manje intercelulara. Smanjuje se gustina stoma i menja njihov oblik, od okruglog u eliptični. One postaju senzitivne na mrak i stomatna transpiracija biva regulisana od strane biljke. Na površini organa razvijaju se kutikula i epikutikularni vosak. U hloroplastima se povećava sadržaj hlorofila (Pospisilova i sar., 1999). Nežni *in vitro* razvijeni korenovi brzo odumiru, a zamenjuju ih korenovi koji se razvijaju u supstratu. Većina biljnih vrsta zahteva postepene promene sredinskih faktora u periodu aklimatizacije, kako bi se izbegli isušivanje i fotoinhibicija fotosinteze. Optimalna stopa rastenja biljaka postiže se tek nakon razvijanja listova i korenova u uslovima staklare.

1.7.1. Fitohormoni

Fitohormoni su organska jedinjenja male molekulske mase, koja obavljaju specifične regulatorne funkcije i ne spadaju u hranljiva jedinjenja. Biljni hormoni regulišu sve faze rasteenja i razvoja biljaka, kao i odgovore biljaka na biotički i abiotički stres. Morfogenetski odgovori na delovanje fitohormona rezultat je njihovih međusobnih interakcija koje mogu biti aditivne, sinergističke ili antagonističke. Efekat jednog hormona na ćeliju može biti različit, zavisno od stadijuma razvicia biljke. U fitohormone spadaju auksini, citokinini, giberelini, etilen, abscisinska kiselina, brasinosteroidi, jasmonati, salicilna kiselina i drugo.

Auksini i citokinini su ključni za regulaciju rasta kulture *in vitro* (Simonović, 2011). Njihov balans određuje razvicia tkiva u pravcu kalusa, izdanaka, ožiljavanja ili embriogeneze. Biljne vrste se razlikuju po tome koje je jedinjenje iz grupe auksina ili citokinina najaktivnije i koje su koncentracije optimalne (Nešković i sar., 2003). Koncentracija aktivnog hormona zavisi od balansa između njegove sinteze i metabolizma koji obuhvata procese konverzije u srodna jedinjenja, transport, konjugaciju, destrukciju i inaktivaciju (Bandurski i sar., 1995; McGaw i Burch, 1995; Nešković i sar., 2003).

Auksini su prvi otkriveni fitohormoni. To su esencijalni fitohormoni i imaju brojne fiziološke funkcije:

- primarno, oni stimulišu ćelijske deobe i izduživanje ćelija,
- stimulišu izduživanje stabla i koleoptila trava,
- imaju glavnu ulogu u apikalnoj dominaciji, tako što učestvuju u korelativnoj inhibiciji mirujućih pupoljaka,
- učestvuju u fototropskoj i geotropskoj reakciji biljaka,
- stimulišu razvicia provodnog tkiva, odlažu senescenciju listova i sazrevanje plodova (Gaspar i sar., 1996).

U kulturi biljnih tkiva *in vitro*, auksini indukuju formiranje adventivnih korenova i bočno grananje korenova, istovremeno inhibirajući rast primarnog korena. Sa citokininima auksini sinergistički stimulišu formiranje i izduživanje izdanaka (Simonović i sar., 2011). Pošto podstiču ćelijske deobe u nediferenciranom tkivu,

auksini se koriste za indukovanje i održavanje kalusa (Simonović i sar., 2011; Vinterhalter i Vinterhalter 1996).

Po hemijskoj prirodi auksini su indolna jedinjenja. Glavni prirodni auksin je indol-3-sirćetna kiselina (IAA). Osim IAA u kulturi *in vitro* često se koriste sintetički auksini: 1-naftilsirćetna kiselina (NAA), 2,4-dihlorfenoksisirćetna kiselina (2,4-D) i indolbuterna kiselina (IBA).

Citokinini su takođe esencijalni fitohormoni, i imaju brojne fiziološke funkcije:

- zajedno sa auksinima regulišu ćelijski ciklus i stimulišu ćelijske deobe,
- sprečavaju apikalnu dominaciju,
- sprečavaju starenje listova i utiču na retenciju hlorofila,
- stimulišu rast bočnih pupoljaka i formiranje *de novo* pupoljaka,
- ispoljavaju bakteriostatičko dejstvo (Gaspar i sar., 1996; Simonović i sar., 2011; Nešković i sar., 2003).

Citokinini su važni za mikropropagaciju biljaka jer ukidanjem apikalne dominacije stabla, omogućavaju izduživanje aksilarnih pupoljaka u pazuhu listova. U procesu rizogeneze, citokinini deluju kao antagonisti auksina i sprečavaju formiranje i rast adventivnih korenova. U kulturi *in vitro* citokinini imaju važnu ulogu u indukciji izdanaka u kalusnom tkivu (Simonović i sar., 2011; Vinterhalter i Vinterhalter 1996).

Citokinini su derivati purinske baze adenina. Prirodni citokinini su: zeatin (4-hidroksi-3-metil-*trans*-2-butenilaminopurin) i *2iP* (N⁶-(2-izopentil) adenin). Osim prirodnih, i kulturi *in vitro* koriste se i sintetički citokinini: kinetin (6-furfurilaminopurin), BAP (6-benzil aminopurin) i TDZ (thidiazuron). Upotreba citokinina visokih koncentracija u kulturi *in vitro* i dug period inkubacije dovode do vitrifikacije kulture (Dunstan i sar., 1985). Zato je važno za svaku vrstu odrediti optimalnu koncentraciju fitohormona koja će se koristiti u kulturi *in vitro*.

1.8. PRODUKCIJA SEKUNDARNIH METABOLITA U KULTURI *in vitro*

Eksploatacija sekundarnih metabolita biljaka iz prirode limitirana je sezonskom dostupnošću, brojnošću vrste u vreme eksploatacije i produkcijom biomase (Roberts, 2007). Brojni farmaceutski važni metaboliti (alkaloidi, glukozidi, flavonoidi, etarska ulja, tanini i dr.) izoluju se iz gajenih biljaka, jer ih je teško ili neekonomično hemijski sintetisati zbog veličine i kompleksne strukture (Wilson i Roberts, 2012). Mnoge vrste koje su izvor važnih sekundarnih metabolita, vezane su za specifične biotope i teško mogu da rastu van svojih originalnih staništa (Bourgaud, 2001), pa se teško gaje. Otežano gajenje nekih biljnih vrsta i narušavanje staništa usled prekomerne eksploatacije biljaka u prirodi, ukazuju na potrebu da se pronađu efikasniji načini gajenja biljaka koji će obezbediti masovnu i kontinuiranu produkciju sekundarnih metabolita.

Kultura biljnih tkiva *in vitro* ima važnu ulogu u produkciji poželjnih metabolita. Poznato je da biljne ćelije, tkiva i organi u kulturi *in vitro* imaju kapacitet da sintetišu i akumuliraju iste fitohemikalije kao i roditeljska biljka iz prirode (Karuppusamy, 2009). Biljne ćelije su biosintetski totipotentne, što znači da svaka ćelija u kulturi zadržava kompletnu genetsku informaciju pa može proizvoditi fitohemikalije kao i roditeljska biljka (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002).

Prednosti kulture tkiva za produkciju sekundarnih metabolita u odnosu na klasične metode istaknuti su od strane mnogih autora (Karuppusamy, 2009; Siahsar i sar., 2011; Vijaya Sree, 2010; Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Mulabagal i Tsay, 2004; Verpoorte i sar., 2002; Matkowski, 2008; Wilson i Roberts, 2012; Fox, 2006; Dornenburg i Knorr, 1995) i podrazumevaju sledeće:

- produkcija sekundarnih metabolita u kulturi biljnih tkiva *in vitro* je u kontrolisanim uslovima, nezavisna od klimatskih, sezonskih i edafskih faktora. Biotički faktori (mikroorganizmi i insekti) koji mogu negativno delovati na rastenje, razviće biljaka i produkciju sekundarnih metabolita u prirodi, u kulturi su izbegnuti,
- biljni materijal se lako umnožava i za kratko vreme dobija se dovoljna količina specifičnih metabolita,

- veća je kontrola sintetskih puteva da bi se dobile željene varijante i proporcije jedinjenja,
- ekstrakcija i prečišćavanje su jednostavniji. Izolacija fitohemikalija je brža i efikasnija od ekstrakcije iz celih biljaka,
- jedinjenja proizvedena *in vitro* direktno odgovaraju jedinjenjima iz celih biljaka,
- interferirajuća jedinjenja koja se javljaju kod biljaka u prirodi, izbegnuta su u kulturi,
- u uslovima *in vitro* moguća je produkcija novih jedinjenja koja se ne nalaze u roditeljskim biljkama u prirodi,
- u kulturi tkiva i ćelija se mogu obezbediti stabilne fitohemikalije uniformnog kvaliteta i prinosa u dužem periodu,
- moguća je selekcija sorti koje imaju visoku produkciju sekundarnih metabolita,
- moguće je u uslovima *in vitro* istraživanje elicitora za produkciju sekundarnih metabolita,
- u kulturi ćelija moguća je stereo- ili regiospecifična biotransformacija za produkciju novih jedinjenja iz jeftinih prekursora,
- automatizacija procesa regulacije rastenja i metabolizma snižava cenu i intenzivira produkciju,
- kultura biljnih tkiva dozvoljava izolaciju genetski modifikovanih biljaka iz okoline bez rizika od transgene migracije,
- radioaktivnim obeležavanjem ćelijskih kultura može se pratiti metabolisanje sekundarnih metabolita u eksperimentalnim životinjama koje se hrane biljnom masom dobijenom u kulturi *in vitro*,
- lakše je zadovoljenje visokih zahteva farmaceutskih proizvođača koji koriste prirodne biljne metabolite.

Preduslovi za biotehnološku produkciju sekundarnih metabolita *in vitro* su ograničena dostupnost biljaka iz prirodnih izvora (retke, ugrožene, prekomerno eksploatisane vrste), ili teško gajenje izvornih biljaka klasičnim metodama, i ekonomičnost (Verpoorte i sar., 2002).

Poslednjih desetak godina kultura biljnih tkiva *in vitro* se intenzivno izučava u svrhu komercijalne produkcije sekundarnih metabolita (Whitmer i sar., 2002). Istražujući literaturne podatke Karuppusamy (2009) navodi da su brojne biljne vrste

uključene u produkciju raznovrsnih sekundarnih metabolita primenom različitih tehnika kulture *in vitro*. Sintetisani su brojni farmaceutski važni sekundarni metaboliti: alkaloidi, saponini, fenoli, flavonoidi (proantocijanidini, antocijanini), izoprenoidi (terpenoidi, staroidi, karotenoidi), etarska ulja, i amino kiseline (Vijaya Sree, 2010; Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002; Matkowski, 2008). Metodom kulture *in vitro* mogu se obezbediti taxol, morfin, kodein, L-DOPA, berberin, diosgenin, capsaicin, vinblastin, kardenolidi, valepotrijati i druga jedinjenja (Vijaya Sree, 2010; Siahsar i sar., 2011).

Među sekundarnim metabolitima sintetisanim u kulturi *in vitro* razlikuju se oni koji mogu biti sintetisani u neorganizovanom kalusnom tkivu ili kulturi ćelijske suspenzije i metaboliti koji se sintetišu u diferenciranim tkivima i razvijenim organima. Tako komponente etarskih ulja koje se sintetišu u žlezdama na površini lista se ne mogu sintetisati i akumulirati u nediferenciranim ćelijama (Karuppusamy, 2009).

Da bi se povećala biosinteza sekundarnih metabolita u kulturi *in vitro* koriste se različite biotehnoške strategije: skrining i selekcija visoko produktivnih ćelijskih linija, kvalitativna i kvantitativna manipulacija sastava hranljive podloge, optimizacija fizičkih faktora u kulturi, dodavanje prekursora, upotreba elicitora, permeabilizacija ćelija, kultivacija u bioreaktorima, kultura "hairy roots", kultura teratomih (tumor nalik) izdanaka, imobilizacija biljne ćelije, biotransformacija i biokonzervacija i drugo.

Zahvaljujući dobroj selekciji ćelijskih linija i uslovima kulture, neki metaboliti se akumuliraju u kulturi ćelija više nego u intaktnim biljkama. Na primer, količine berberina u kulturi ćelija *Coptis japonica* (Matsubara i sar., 1989), ginsenzida u kulturi *Panax ginseng* (Choi i sar., 1994), ružmarinske kiseline u kulturi *Coleus blumei* (Ulbrich i sar., 1985), šikonina u kulturi *Lithospermum erythrorhizon* (Takahashi i Fujita, 1991), diosgenina u kulturi *Dioscorea* sp. (Matsumoto i sar., 1980), i ubikinona u kulturi *Nicotiana tabacum* (Fontanel i Tabata, 1987), znatno prevazilaze njihovu akumulaciju u biljkama iz prirode.

Varirajući sastav hranljive podloge može se u velikoj meri uticati na produkciju i akumulaciju sekundarnih metabolita. Komponente hranljive podloge u *in vitro* sistemima gajenja biljaka su važne determinante ne samo za razviće već i za akumulaciju sekundarnih metabolita. Nivo šećera, azota, fosfata i regulatora rastenja može u znatnoj meri uticati na prinos bioaktivnih metabolita. Šećer svojom dvostrukom

ulogom, kao izvor ugljenika i osmotikum utiče na produkciju metabolita. Odnos amonijum/nitrati-azot i ukupan azot kanališu produkciju sekundarnih metabolita. Visok nivo fosfata stimuliše rastenje, ali negativno utiče na akumulaciju sekundarnih metabolita u *in vitro* sistemima većine biljaka, iako se beleže i obrnuti rezultati (Ramachandra Rao i Ravishankar 2002). Koncentracija regulatora rasteinja je često krucijalni faktor u akumulaciji sekundarnih produkata. Tip i koncentracija auksina i citokinina i odnos auksin/citokinin deluju na rastenje, kao i formiranje bioprodukata u kulturi *in vitro*. Dodatak IAA u podlogu za kulturu korenova *Cephaelis ipecacuanha*, ili kulturu ćelijske suspenzije i kulturu kalusa *Cinchona ledgeriana* povećava produkciju alkaloida, dok u kulturi transformisanih ćelija nema efekta (Sauerwein i sar., 1992). Kultura izdanaka *Gentianella austriaca* sadrži iste sekundarne metabolite kao i biljke iz prirode, ali u nižim koncentracijama. Na produkciju sekundarnih metabolita veoma utiče prisustvo BA u podlozi (Vinterhalter i sar., 2008). Jasmonati povećavaju akumulaciju sekundarnih metabolita u kulturi ćelijskih suspenzija brojnih vrsta (Gundlach i sar., 1992). I pored ostvarene sinteze etarskih ulja u kulturi *in vitro*, nedovoljno je poznato delovanje regulatora rasteinja na prinos i sastav etarskih ulja. Aktivnost i balansiran odnos različitih fitohormona utiče na kvalitativnu u kvantitativnu produkciju komponenti etarskih ulja (Prins i sar., 2010). Primena GA kod *Salvia officinalis* povećava prinos ulja (Poyh i Ono, 2006), dok kod *Cymbopogon citratus* nema uticaja (Figueiredo i sar., 2006). Tretirajući citokininima različite vrste Lamiaceae El-Keltawi and Croteau (1987) beleže povećanu produkciju etarskih ulja. Sadržaj etarskih ulja u biljkama dobijenim *in vitro* gajenjem je često veći nego kod biljaka u prirodi, upravo zbog prisustva egzogenih regulatora rasteinja (Arikat i sar., 2004).

Uslovi sredine u kulturi *in vitro* kao što su svetlost, temperatura, pH podloge i aeracija mogu delovati na prinos sekundarnih metabolita. Iako je uobičajen temperaturni opseg u kulturi 17-25 °C, svaka vrsta zahteva različitu temperaturu. Svetlost može stimulisati akumulaciju nekih metabolita npr. antocijanina, dok se za druge metabolite bolji rezultat postiže u mraku. Svetlost ima važnu ulogu u stimulanju biosinteze diterpena (Caruso i sar., 2000; Kuźma i sar., 2006). Sastav seskviterpena u kulturi kalusa *Marticaia chamomilla* zavisi od svetlosti, dok u kulturi kalusa *Citrus limon* mrak stimuliše akumulaciju monoterpena (Mulder-Krieger i sar., 1988). Inkubacija transformisanih ćelijskih kultura *Cinchona ledgeriana* na plavoj i beloj svetlosti inhibira

produkciju alkaloida, dok je inkubacija u tami povećava (Sauerwein i sar., 1992). Sastav gasova u kulturi utiče na produkciju isparljivih jedinjenja. Pri povećanoj koncentraciji ugljen dioksida, stimuliše se sintezu monoterpena (Ambid i Fallot, 1981).

Egzogena primena prekursora u hranljivoj podlozi u kulturi *in vitro* može povećati prinos željenih sekundarnih metabolita. U tu svrhu koriste se intermedijarna ili jedinjenja sa početka biosintetskog puta, koja utiču na sled reakcija, povećavajući prinos finalnog proizvoda. Dodatak fenilalanina povećava produkciju rozmarinske kiseline u kulturi *Salvia officinalis* (Ellis i Towers, 1970) i taksola u kulturi *Taxus* sp. (Fett-Neto i sar., 1993). Vreme dodavanja prekursora je veoma važno za postizanje optimalnog efekta (DiCosmo i Misawa, 1995).

Elicitori su signalni molekuli koji u niskim koncentracijama iniciraju ili pospešuju biosintezu specifičnih bioaktivnih molekula i izazivaju fiziološke i morfološke odgovore biljaka. Tretman biljaka elicitorima kao i napad patogenima pojačava akumulaciju sekundarnih metabolita, prevashodno fitoaleksina (Namdeo, 2007). Dve glavne klase fitoaleksina su terpenoidi i izoflavonoidi. Stresni uslovi pojačavaju sintezu sekundarnih metabolita, pa regulatori rastenja povezani sa stresom - jasmonati, imaju široku primenu u stimulisanju biosinteze inducibilnih i konstitutivnih sekundarnih metabolita (Mulabagal i Tsay, 2004; Verpoorte i sar., 2002). Po svom poreklu elicitori mogu biti biotički i abiotički (Namdeo, 2007). Biotički elicitori uključuju polimere glukana, glukoproteine, organske kiseline male molekulske mase, komponente ćelijskog zida gljiva i drugo. Njihovim delovanjem dolazi do promena na nivou membranskog potencijala, fluksa jona, oksidacionih reakcija, fosforilacije proteina i drugo. U abiotičke elicitore spadaju UV zračenje, pH, soli teških metala i druge hemikalije koje dovode do stresa. Oni dovode do oštećenja membrane. Pošto se abiotički elicitor veže za specifičan proteinski receptor na plazma membrani, dolazi do inhibicije ATPaze i redukcije protonskog elektrohemijjskog gradijenta na nivou membrane. Acidifikacija citoplazme zbog inaktivacije H^+ -ATPaze smanjuje membranski potencijal (Dornenburg i Knorr, 1995). Pojačava se influks Ca^{2+} iz ekstracelularne sredine u citoplazmu, a u nekim slučajevima se aktiviraju MAP kinaza i G-protein (Namdeo, 2007). Različiti elicitori različito deluju na biosintetsku kompetentnost ćelija. Poreklo, specifičnost i koncentracija elicitora, vreme ekspozicije, fizikohemijske odlike kulture *in vitro*, dinamika subkultivacije, stadijum razvića,

usvajanje nutrijenata i drugo, utiču na sled događaja po delovanju elicitora (Namdeo, 2007). Stimulišući sintezu sekundarnih metabolita u kulturi, oni smanjuju vreme koje je potrebno da bi se dobila visoka koncentracija produkata. Iako mehanizam delovanja elicitora još uvek nije sasvim rasvetljen, elicitacija se smatra najuspešnijom strategijom za pojačanu produkciju sekundarnih metabolita (Bourgau i sar., 2001).

Neretko se za pojačanu produkciju sekundarnih metabolita koristi "hairy roots" kultura. Nekoliko vrsta familije Lamiaceae je transformisano sa *Agrobacterium rhizogenes* za pojačanu produkciju polifenolnih antioksidanata u kulturi (Matkowski, 2008). Kultura "hairy roots" uspostavljena je kod *Salvia officinalis* (Grzegorzcyk et al. 2006), *S. miltiorrhiza* (Chen i sar., 2001; Yan i sar., 2006), *Coleus blumei* (Bauer i sar., 2004), *Ocimum basilicum* (Bais i sar., 2002), *Hyssopus officinalis* (Murakami i sar., 1998). U većini slučajeva transformisani korenovi daju pozitivne rezultate u produkciji sekundarnih metabolita.

Uklanjanje *in situ* produkata upotrebom ne-bioloških adsorbenata, ili njihovo maskiranje, povećava ukupnu proizvodnju sekundarnih metabolita (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002).

U sistemima kulture *in vitro* pored toga što se dobijaju biljni metaboliti mogu se sintetisati strani metaboliti u transgenim biljkama (Ramachandra Rao i Ravishankar, 2002).

Kultura biljnih tkiva je dobra metoda za izučavanje biosintetskih puteva i produkciju sekundarnih metabolita. Biotehnološka produkcija sekundarnih metabolita u kulturi *in vitro* atraktivna je alternativa njihove eksploatacije iz prirode. I pored brojnih prednosti za sada ima ograničen komercijalni značaj usled nepoznavanja biosinetskih puteva sekundarnih metabolita, ili malog prinosa. Ubrzan razvoj metaboličkog inženjeringa može obezbediti soluciju za poboljšanje produktivnosti. Napredak na nivou molekularne biologije, enzimologije, fermentacione biotehnologije sugerise da metode kulture *in vitro* mogu biti realan izvor važnih sekundarnih metabolita (Abdin, 2007; Siahsar i sar., 2011).

2. CILJEVI

Osnovni naučni cilj ove disertacije je ispitivanje efekata regulatora rasteńja na morfogenezu i produkciju etarskih ulja endemičnih vrsta *M. pulegium* i *M. croatica* *in vitro*. U okviru disertacije kao posebni ciljevi postavljaju se:

- razvijanje i optimizacija protokola za regeneraciju endemičnih vrsta *M. pulegium* i *M. croatica* putem aksilarnih pupoljaka *in vitro*
- analiza morfoloških parametara regenerisanih izdanaka
- mikromorfološka i histocitološka karakterizacija trihoma listova regenerisanih izdanaka
- analiza biokemijskih parametara regenerisanih izdanaka: etarskih ulja (kvantitativna i kvalitativna); kemijskog sastava metanolnih, etil-acetatnih i heksanskih ekstrakata
- analiza antioksidativnih i antimikrobnih svojstava metanolnih ekstrakata regenerisanih izdanaka

3. MATERIJAL I METODE

3.1. BILJNI MATERIJAL

Za potrebe istraživanja biljni materijal je sakupljen u skladu sa postojećim propisima o zaštiti i održivom iskorišćavanju biljnih vrsta. Sakupljani su isključivo nadzemni delovi biljaka (*M. pulegium* i *M. croatica*) tokom vegetativne faze, iz prirodnih populacija u količini koja ne narušava njihovu regeneraciju u prirodi.

Biljni materijal vrste *M. pulegium* je prikupljen u junu 2012. god. u istočnoj Srbiji na lokalitetu pored sela Podvis u klisuri Svrljiškog Timoka. Geografska pozicija lokaliteta na kojem je vršeno sakupljanje okarakterisana je sledećim koordinatama: 43°32'23.32" severne geografske širine i 22°10'15.74" istočne geografske dužine, na 273 m nadmorske visine.

Biljni materijal vrste *M. croatica* je prikupljen u maju 2012. g u zapadnoj Srbiji na lokalitetu u klisuri Belog Rzava, u blizini sela Kotroman, sa sledećim geografskim odrednicama: **43°46'25.83"** severne geografske širine i **19°27'44.22"** istočne geografske dužine, na 512 m nadmorske visine. Na istom lokalitetu je sakupljeno i seme *M. croatica*, septembra 2012. god. Do upotrebe, seme je čuvano u frižideru na temperaturi 4 °C.

Uzorkovanje *M. pulegium* i *M. croatica* je odobreno dozvolom (No. 353-01-530/2012-03) Ministarstva zaštite životne sredine, rudarstva i prostornog planiranja. Uzorci su determinisani u skladu sa relevantnim literaturnim izvorima, "Flora Europaea" (Chater i Guinea, 1972) i "Flora SR Srbije" (Diklić, 1974; Diklić i Nikolić, 1986). Identifikacija sakupljenog materijala je obavljena od strane dr Bojana Zlatkovića (docenta PMF u Nišu). Herbarizovan biljni materijal vrsta *M. pulegium* (Vaucher No. 6912) i *M. croatica* (Vaucher No. 6913) je deponovan u Herbarijumu Prirodno matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu (HMN).

Izuzev biljaka koje su sveže korišćene za kulturu *in vitro*, ostatak biljnog materijala je sušen po standardnoj proceduri, u trajanju od deset dana, raširen u tankom sloju na otvorenom prostoru, izdignut od podloge. Osušeni materijal je spakovan u papirne kese i čuvan na suvom i hladnom mestu do upotrebe.

3.2. POVRŠINSKA STERILIZACIJA BILJNOG MATERIJALA

Primarni eksplantati korišćeni za uvođenje *M. pulegium* u kulturu *in vitro* bili su segmenti stabla sa jednim nodusom i dva pazušna listića. Primarni eksplantati su površinski sterilisani 30% - tnim rastvorom varikine (Na-hipohlorit sa 4% aktivnog hlora - komercijalni izbeljivač *Snežnik Panonija AD*) tokom 25 min. Pošto su isprani tri puta, eksplantati su tretirani 24 časa 5% - tnim rastvorom nistatina kako bi se eliminisala moguća gljivična infekcija. Po isteku vremena, eksplantati su isprani tri puta sterilnom destilovanom vodom, prosušeni par minuta u otvorenoj petri kutiji i u aseptičnim uslovima postavljeni na hranljivu podlogu.

Za uspostavljanje kulture *in vitro* *M. croatica*, korišćena su zrela semena. Semena su jedan minut potopljena u 96% - tni etanol kojem je dodata kap komercijalnog deterdženta. Nakon ispiranja destilovanom vodom semena su potopljena u 0,1% HgCl_2 tokom 20 minuta. Pošto su semena ispirana 3 puta sterilnom destilovanom vodom u trajanju od 20 minuta, tretirana su 25 minuta 30% - tnim rastvorom varikine. Po ispiranju, semena su bila potopljena 24 časa u 5% - tni rastvor nistatina. Nakon ispiranja, semena su ostavljena 15 sati u 0,2% KNO_3 , a onda postavljana pojedinačno u epruvete, na MS podlogu bez regulatora rastenja.

3.3. SASTAV HRANLJIVIH PODLOGA

Hranljiva podloga korišćena u kulturi *in vitro* je Murashige, T. i Skoog, F. (1962) MS podloga, koja sadrži odgovarajuće makro, mikro mineralne soli i organske dodatke (tab. 2, 3). Sve podloge sadržale su 100 mg l^{-1} myo-inozitola, 30 g l^{-1} saharoze i 7 g l^{-1} agara (Torlak, Beograd, Srbija).

Neposredno pre autoklavliranja, pH podloge je proveren i po potrebi podešen na 5,8 dodavanjem 0,1N NaOH u kapima. Hranljive podloge su razlivene u tegle, odnosno staklene epruvete i sterilisane u autoklavu 30 min na 120°C .

Tabela 2. Sastav rastvora mineralnih soli MS (Murashige i Skoog, 1962)

Makroelementi	mg L ⁻¹	mM
KNO ₃	1. 900,000	18.793
NH ₄ NO ₃	1. 650,000	20.612
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370,000	1.501
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440,000	2.993
KH ₂ PO ₄	170,000	1.249
Mikroelementi	mg L ⁻¹	mM
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,300	100.000
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,600	29.907
H ₃ BO ₃	6,200	100.259
KI	0,830	4.999
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,250	1.033
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	0.100
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025	0.105
FeSO ₄ x 6H ₂ O	27,800	99.989
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,200	99.933

Tabela 3. Sastav rastvora vitamina MS (Murashige i Skoog, 1962)

Vitamins	mg L ⁻¹	mM
Tiamin hlorid (B1)	0,100	0,296
Piridoksin hlorid (B6)	0,500	1,348
Nikotinska kiselina (B3)	0,500	4,061
Glicin	2,000	26,642
Mio-inozitol	100,000	555,062

3.3.1. Sastav hranljivih podloga za indukciju aksilarnih pupoljaka

Eksplantati *M. pulegium* i *M. croatica* gajeni su na MS podlozi: bez regulatora rasteća, sa auksinom (0,57 μ M IAA), citokininima (BA ili kinetinom) različitim koncentracijama, kao i kombinaciji auksina (0,57 μ M IAA) i citokinina (BA ili kinetin) različite koncentracije. Korišćene su 26 hranljive podloge (tab. 4).

Tabela 4. Hranljive podloge za indukciju aksilarnih pupoljaka vrsta *Micromeria*

	Regulatori rasteća (μ M)
1.	-
2.	0,1 BA
3.	0,3 BA
4.	1 BA
5.	3 BA
6.	10 BA
7.	30 BA

8.	0,57 IAA
9.	0,57 IAA 0,1 BA
10.	0,57 IAA 0,3 BA
11.	0,57 IAA 1 BA
12.	0,57 IAA 3 BA
13.	0,57 IAA 10 BA
14.	0,57 IAA 30 BA
15.	0,1 kin
16.	0,3 kin
17.	1 kin
18.	3 kin
19.	10 kin
20.	30 kin
21.	0,57 IAA 0,1 kin
22.	0,57 IAA 0,3 kin
23.	0,57 IAA 1 kin
24.	0,57 IAA 3 kin
25.	0,57 IAA 10 kin
26.	0,57 IAA 30 kin

Svaka od pripremljenih hranljivih podloga je razlivena u 3 teglice (po 70 ml) i u svaku teglicu postavljeno je po 10 eksplantata približno iste veličine (5 mm). Na taj način svakim tretmanom je obuhvaćeno po 30 eksplantata. Ogled je ponovljen dva puta.

Eksplantati su četiri nedelje rasli i na njima je došlo do formiranja pupoljaka. Nakon toga evidentirani su eksplantati koji su reagovali na tretman i mereni su sledeći parametri: broj aksilarnih pupoljaka po eksplantatu, dužina svakog pupoljka, sveža i suva masa svakog eksplantata. Dužina pupoljaka merena je na milimetarskom papiru. Pupoljci manji od 1mm nisu razmatrani. Sveži eksplantati nakon izmerene mase su sušeni u zasebnim papirnim kontejnerima, a potom im je merena suva masa na istoj analitičkoj vagi.

3.3.2. Sastav hranljivih podloga za indukciju korenova

Za indukciju korenova na izdancima obe vrste korišćena je podloga MS sa upola smanjenom koncentracijom mineralnih soli (MS/2) u koju je dodat jedan od tri auksina (IAA, NAA ili IBA) u četiri koncentracije (tab. 5). Kontrolna podloga nije sadržala regulatore rastenja.

Sa eksplantata koji su rasli na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja nakon 4 nedelje aseptično su izolovani izdanci i postavljeni na podloge za ožiljavanje. Korišćeni su dobro razvijeni izdanci dugi 10-15 mm. Na svaku podlogu postavljeno je po 30 izdanaka, u tri tegle po 10. Ogled je ponavljen dva puta. Po isteku 4 nedelje, ožiljeni izdanci su fotografisani i izmerena je dužina korenova formiranih na bazalnom kraju izdanaka. U tu svrhu korišćen je softverski program Digimizer (Digimizer Image Analysis software (MedCalc Software, Belgium))

Tabela 5. Hranljive podloge za indukciju korenova vrsta *Micromeria*

Podloge sa IAA	Podloge sa NAA	Podloge sa IBA
MS/2 + IAA 0,1 mg/ml	MS/2 + NAA 0,1 mg/ml	MS/2 + IBA 0,1 mg/ml
MS/2 + IAA 0,2 mg/ml	MS/2 + NAA 0,2 mg/ml	MS/2 + IBA 0,2 mg/ml
MS/2 + IAA 0,3 mg/ml	MS/2 + NAA 0,3 mg/ml	MS/2 + IBA 0,3 mg/ml
MS/2 + IAA 1,0 mg/ml	MS/2 + NAA 1,0 mg/ml	MS/2 + IBA 1,0 mg/ml

3.4. USLOVI GAJENJA KULTURE

Sve uspostavljene kulture vrsta *Micromeria*, kao i propagirane biljke tokom aklimatizacije bile su pod jednakim temperaturnim i svetlosnim režimom koji nisu menjani tokom oglada. U komori za kulturu tkiva održavana temperatura je $23^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, a fotorežim je 16 sati svetlosti i 8 sati mraka. Gustina svetlosnog fluksa na stalažama sa biljnim kulturama bila je $47 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$.

3.5. AKLIMATIZACIJA KULTURA

Izdancima koji su se ukorenili na podlogama za ukorenjavanje tj. mikropropagiranim biljkama su po uklanjanju sa podloga ispirani korenovi destilovanom vodom da bi se uklonili ostaci agarne podloge. Na taj način smanjuje se rizik od pojave infekcije tokom aklimatizacije. Potom su biljke posađene u zemlju u plastične čaše $4 \times 4 \times 6$ (cm) i pokrivene providnom plastičnom folijom. Plastične čaše u kojima su biljke gajene imale su probušeno dno zarad dobre drenaže prilikom zalivanja vodom. Korišćena je zemlja za komercijalnu upotrebu - Substral poznatog sastava. Pre punjenja plastičnih čaša, zemlja je usitnjena i sterilisana suvom sterilizacijom 60 minuta na 120°C . Nakon prva tri dana, tokom prve nedelje aklimatizacije svakodnevno je uklanjana folija u trajanju od 5 minuta, naredne sedmice u trajanju od 10 minuta, a treće sedmice taj vremenski interval je produžen na 30 minuta. Četvrte sedmice aklimatizacije, gradacijski je produžavano vreme tokom kojeg su biljke bile otkrivene. Biljke su potpuno otkrivene 28. dana, a 35. dana je evidentiran broj aklimatizovanih biljaka. Tokom aklimatizacije, biljke su po potrebi zalivane destilovanom vodom.

3.6. MIKROSKOPSKA ANALIZA

Za utvrđivanje prisustva i identifikaciju tipova trihoma na listovima, biljni materijal je pripreman i analiziran skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) i svetlosnom mikroskopijom (LM).

3.6.1. Priprema biljnog materijala za skenirajuću elektronsku mikroskopiju

Sveži listovi *M. pulegium* i *M. croatica* isečeni su na manje segmente, montirani na nosače, osušeni do kritične tačke i obloženi mešavinom zlata i paladijuma. Posmatranje i snimanje je izvršeno na skenirajućem elektronskom mikroskopu JSM – 6390LV (Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu).

3.6.2. Priprema biljnog materijala za svetlosnu mikroskopiju

Biljni materijal je fiksiran u rastvoru: 3% glutaraldehyd i 0,1 M fosfatni pufer (pH 7.2) na 4°C, 24 sata, a postfiksiran u osmijum-tetroksidu (2% rastvor osmijum-tetroksida u fosfatnom puferu), 2h, na sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim dehidratirani serijom alkohola rastuće koncentracije. Kalupljenje je izvršeno u smoli (Araldite resin CY 212, Agar Scientific Ltd. England). Preseci debljine 1,5 µm sečeni su na LKB III ultramikrotomu i obojeni 0,1% metilen-plavim.

3.6.2.1. Histocitološka analiza listova *Micromeria*

Za dokazivanje terpena korišćen je NADI reagens (David i Carde, 1964). Sveži listovi, ručno sečeni žiletom na preseke širine oko 1 mm, potapani su u sveže pripremljen NADI reagens 1 sat u mraku na sobnoj temperaturi, a zatim su isprani u natrijum - fosfatnom puferu 0,1M, pH 7.2 oko 2 minuta.

Za pripremu NADI reagensa potrebno je sastaviti sledeće komponente: 0,1% α - naftol u 40% etanolu 0,5ml + 1% N - N dimethyl - p - phenylen diamine 0,5 ml + natrijum fosfatni pufer 0,05 M pH 7,2 49.0 ml.

Za kontrolu korišćeni su preseći prethodno tretirani smešom metanola, hloroforma, vode i hlorovodonične kiseline u odnosu 66 : 33 : 4 : 1, tokom 3 sata na sobnoj temperaturi u mraku. Kontrolni uzorci su zatim držani 3 minuta u 50% etanolu, nakon čega su sprovedeni kroz boju i dalje tretirani kao obojeni preseći. Preparati iz tretmana i kontrole su stavljeni u kap glicerola, na predmetno staklo i snimani na mikroskopu.

Pozitivna reakcija pokazala je da se etarska ulja boje plavo, dok se smole boje tamno crveno. Prisustvo smeše etarskog ulja i smola konstatuje se ljubičastom do ljubičasto - crvenom bojom u zavisnosti od prisustva količine pojedinih komponenata unutar smeše.

3.7. METODE ZA ANALIZU ETARSKIH ULJA

3.7.1. Izolacija etarskih ulja

Ulja su izolovana iz osušenih nadzemnih delova biljaka iz prirode *M. pulegium* i *M. croatica*, i osušenih izdanaka ovih vrsta gajenih u kulturi *in vitro* na dvema hranljivim podlogama, na podlozi MS bez fitohormona i na podlozi MS sa fitohormonom, na kojoj je ostvaren najveći prinos biomase. Najveći prinos biomase *M. pulegium* je ostvaren na podlozi MS sa 10 μ M BA. *M. croatica* je imala najveću biomasu na podlozi MS sa 0,3 μ M kinetina.

Korišćeni su izdanci biljaka u vegetativnoj fazi razvića. Ulja su izolovana postupkom destilacije pomoću vodene pare u aparatu po Klevendžeru, tokom 2 sata, postupkom po Evropskoj farmakopeji 7.0 (Europ. Ph., 7.0). Ulja su kao čista ili rastvorena u n-heksanu (ako je izolovana količina ulja ispod 0,1 ml) dehidratisana bezvodnim natrijum sulfatom, a zatim do momenta analize čuvana u staklenim bočicama na temperaturi od - 4°C.

3.7.2. Analiza sastava etarskih ulja

Kvantitativna i kvalitativna analiza dobijenih etarskih ulja urađena je primenom metoda gasne hromatografije (GC) i gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS).

Gasna hromatografija (GC) - Analize su urađene na aparatima Agilent 6890N koji je povezan sa plameno-jonizujućim detektorom (FID) i *split-splitless* injektorom i kapilarnom kolonom HP-5MS (30 m x 0,32 mm; debljina filma stacionarne faze 0,25 μm). Kao noseći gas korišćen je helijum sa brzinom protoka 1,0 ml/min. Temperatura injektora je bila 200°C, FID detektora 300°C. Temperatura kolone je linearno programirana od 60 °C – 280 °C sa promenom od 3 °C/min. Injektovan je 1 μl etanolnog rastvora etarskog ulja u split modu (10:1).

Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS) - GC - MS analiza je urađena na gasnom hromatografu Agilent 6890N sa Agilent 5975 MSD detektorom i kapilarnom kolonom HP-5 MS (30 m x 0,32 mm; debljina filma stacionarne faze 0,25 μm). Kao noseći gas korišćen je helijum sa brzinom protoka 1,0 ml/min. Temperaturni program bio je isti kao i za GC analizu. Temperatura injektora iznosila je 200 °C, a temperatura transfer linije 250 °C.

3.7.3. Identifikacija komponenti etarskih ulja

Komponente etarskih ulja identifikovane su na osnovu poređenja retencionih vremena, Kovačevih indeksa i masenih spektara sa odgovarajućim podacima za jedinjenja iz kompjuterske datoteke NIST, AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System), Adams i literature (Adams, 2001). Linearni retencionni indeksi (Kovačevi indeks, KI) određeni su u odnosu na homologi niz *n*-alkana ($\text{C}_8\text{-C}_{40}$) pod istim eksperimentalnim uslovima. Procentualni udeo pojedinih komponenata etarskih ulja određen je na osnovu površina dobijenih integracijom pikova korišćenjem FID detektora.

3.8. PRIPREMANJE EKSTRAKATA *Micromeria*

Ekstrakcija podrazumeva izolovanje sekundarnih metabolita biljaka koji su rastvoreni u datom rastvaraču, a prema principu “slično se u sličnom rastvara”, odnosno komponente slične polarnosti korišćenom rastvaraču će se u datom rastvaraču rastvoriti. Za pripremanje ekstrakata suva herba *Micromeria* iz prirode i *Micromeria* gajenih u uslovima *in vitro* je usitnjena do konzistencije grubog praška i ekstrahovana pomoću organskih rastvarača različite polarnosti i to: metanola, etil-acetata i heksana (10 ml). Ekstrakt je pripremljen tako što je 1,0 g usitnjenog biljnog materijala stavljen u Erlenmajer zapremine 50 ml, prelišen sa 10 ml rastvarača i mešan ultrazvučno četiri puta po 15 minuta. Ekstrakti su zatim filtrirani preko filter papira Whatman No. 1. Sakupljeni filtrati su upareni do suva na vakuumu, izmereni, spakovani u tamne bočice i čuvani na hladnom i tamnom mestu. Neposredno pre analize pripremani su rastvori ekstrakata odgovarajuće koncentracije, rastvaranjem odmerene mase ekstrakta u odgovarajućoj zapremini rastvarača.

3.9. TEČNA HROMATOGRAFIJA SA MASENOM SPEKTROMETRIJOM VISOKE REZOLUCIJE

Finalna koncentracija svih pripremljenih ekstrakata koji su analizirani tečnom hromatografijom visoke efikasnosti sa masenom spektrometrijom visoke rezolucije, bila je 0,2 mg/ml. Uzorak od 5 μ l je ubrizgan u reverzno-faznu kolonu C18 Symmetry (2,1-150,5 mm) proizvođača Waters (Irska). Odvajanje različitih vrsta postignuto je u izokratskom režimu uz upotrebu acetonitrila i vode u odnosu (1:1, v/v) sa dodatkom 0,1% mravlje kiseline pri brzini protoka od 200 μ l/min. Maseni spektri jedinjenja, urađeni su na aparatu LTQ Orbitrap XL proizvođača Thermofisher Scientific (San Jose, CA, USA), uz spoljnu kalibraciju za preciznost merenja od 5 ppm. Parametri za pozitivan ESI mod su sledeći: napon ESI igle 4 kV, napon kapilare 20 V, temperatura kapilare -275 °C, nebulizer gas N₂ 70 arbitrarnih jedinica (a.u.), pomoćni gas 20 a.u. i napon konusa od 80 V. Maseni spektri su snimani u rasponu 145–900 Da. Rezolucija mase bila je podešena na 6-104 za signal mase m/z 400 (Liu i sar., 2007).

Hemijski sastavi biljaka iz prirode i biljaka gajenih *in vitro* određen je analizom ekstrakata različite polarnosti tečnom hromatografijom visoke efikasnosti sa ESI

izvorom jonizacije i detekcijom visoke rezolucije (orbitrap). Dobijeni maseni spektri su upoređeni sa literaturnim podacima dobijenim za jedinjenja iz ekstrakata različitih biljnih vrsta iz familije Lamiaceae, koja su snimana odgovarajućom metodom masene spektrometrije sa istim izvorom jonizacije, i na taj način određena njihova struktura.

3.10. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA

Za procenu antioksidativnih osobina ekstrakata primenjeno je pet različitih metoda i to: procena aktivnosti za hvatanje slobodnih radikala (DPPH i ABTS), ukupna redukciona moć primenom Fe(III) /Fe(II) sistema, određivanje sadržaja ukupnih fenola i određivanje sadržaja ukupnih flavonoida. Svi ekperimenti su izvođeni u tri odvojena eksperimenta i rezultati predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

3.10.1. DPPH metoda

Određivnje antioksidativne sposobnosti DPPH metodom rađeno je spektrofotometrijski uz korišćenje stabilnog DPPH (2,2 - difenil, 1 - pikril hidrazil) radikala. Napravljen je metanolni rastvor DPPH radikala koji apsorbuje na 517 nm malo preko jedinice tako da u reakciji sa potencijalnim antioksidansom, usled potrošnje DPPH, apsorbancija opada na vrednosti od 0,2 do 0,8. Po 1 ml metanolnog rastvora DPPH radikala sipan je u test epruvete. Potom je u epruvete dodat 1 ml metanolnog rastvora ekstrakta *Micromeria*. Uzorci su inkubirani u tami 30 minuta na sobnoj temperaturi ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Blank proba kojom je podešen na nulu spektrofotometar je 100% metanol, a slepa proba je DPPH rastvor. Kivete sa uzorcima postavljene su u spektrofotometar i očitane su vrednosti apsorbance na 517 nm.

$$\% \text{ smanjenja apsorbancije (na 517 nm)} = (A_0 - A_1) \times 100 / A_0$$

A_0 – srednja vrednost apsorbancije slepe probe;

A_1 – srednja vrednost apsorbancije uzorka

Kao referentni standard korišćen je rastvor BHT (butil hidroksi toluen) čiji je rastvor jednake koncentracije kao i ekstrakt *Micromeria* (1 mg/mL) (Mitić i sar., 2011).

3.10.2. ABTS metoda

Rastvor $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (2,2'-azino-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) je pripremljen po proceduri Re (Re i sar., 1999). $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikal katjon je dobijen u reakciji 7 mM ABTS sa 2,45 mM rastvorom kalijum-persulfata. Reakciona smeša je ostavljena na tamnom mestu 16 sati na sobnoj temperaturi i korišćena tokom naredna dva dana. $\text{ABTS}^{\cdot+}$ rastvor je razblažen etanolom, kako bi se obezbedila apsorbancija od $0,700 \pm 0,050$ na 734 nm. Svi uzorci su adekvatno razblaženi tako da apsorbancija iznosi 20 - 80% apsorbancije slepe probe. 50 μL razblaženog uzorka je pomešano sa 1,9 ml razblaženog $\text{ABTS}^{\cdot+}$ rastvora. Odmah po isteku 6 min inkubacije na sobnoj temperaturi, meri se apsorbancija na 734 nm. Rastvor Troloxa u intervalu koncentracija 0 – 15 M korišćen je kao referentni standard. Rezultati su prikazani kao μmol Trolox ekvivalenata/g suve mase herbe *Micromeria* (Li i sar., 2007).

3.10.3. Određivanje ukupne redukcionne moći primenom $\text{Fe(III)}/\text{Fe(II)}$ sistema

Svaki od pripremljenih ekstrakata (10 μL) pomešan je sa $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1 mL, 1%) i $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ puferom (1 mL, 0,2 mol/L, pH 6,6). Ove smese su inkubirane na temperaturi 50 °C tokom 30 minuta. Potom je dodata trihlosirćetna kiselina (1 mL, 10%). Zatim su smeše centrifugirane na 3000 rpm 10 minuta. Po završenom centrifugiranju uzeta je frakcija supernatanta (1 mL), i pomešana sa destilovanom vodom (1 mL) i FeCl_3 (0,2 mL, 0,1%). Kao referentni standard korišćen je rastvor askorbinske kiseline polazne koncentracije 1000 $\mu\text{g/mL}$, tretiran na isti način kao i ispitivani ekstrakti. Apsorbancije tako dobijenih reakcionih smeša merene su na 700 nm. AEAC je računata primenom sledeće jednačine:

$$\text{AEAC} = C_A \cdot A_S / A_A$$

Gde je C_A -konačna koncentracija askorbinske kiseline u $\mu\text{g/mL}$, A_S -apsorbancija uzorka, A_A -apsorbancija askorbinske kiseline.

3.10.4. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je spektrofotometrijskom metodom po Folin-Ciocalteu uz korišćenje galne kiseline kao referentnog standarda. Jedan ml metanolnog ekstrakta herbe *Micromeria* dodat je u 2 ml Folin-Ciocalteu reagensa. Smeša je ostavljena da odstoji 5 minuta pre nego što je dodato 2 ml rastvora natrijum karbonata (Lee i sar., 2003) a zatim promešana i inkubirana na sobnoj temperaturi (~ 25 °C) tokom 1 sata. Vrednost apsorbancije uzoraka merena je na 760 nm u odnosu na slepu probu koju predstavlja ista reakciona smeša, samo sa dodatkom metanola umesto ekstrakta (Mitić i sar., 2011). Koncentracije ukupnih fenola u uzorcima izražene su u miligramima ekvivalenta galne kiseline po gramu suvog ekstrakta (mg GAE/g SE).

3.10.5. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Od metanolnih ekstrakata *Micromeria* uzeto je po 100 µL i dopunjavano je do konačne zapremine od 10 mL reakcionim reagensom (MeOH/H₂O/CH₃COOH=14:5:1). Od ovog rastvora uzet je 1 mL i razblažen destilovanom vodom do 20 mL.

Od tako pripremljenog rastvora uzeto je 10 mL i pomešano sa reagensom AlCl₃ (5 mL, 133 mg AlCl₃·6H₂O i 400 mg CH₃COONa rastvoreni u 100 mL vode). Posle 5 min, apsorbancija rastvora je merena prema slepoj probi (sadrži sve reagense, sem uzorka) na 430 nm. Ukupni sadržaj flavonoida je izračunavan na osnovu kalibracione prave rutina i izražen je kao mg rutina/g suvog ekstrakta (mg/g SE).

3.11. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA BILJNIH VRSTA RODA *Micromeria*

Komparativna analiza antimikrobne aktivnosti ekstrakata biljnih vrsta roda *Micromeria*, prikupljenih iz prirode i gajenih u uslovima *in vitro*, je izvršena uz pomoć mikrodilucione metode sa izvesnim modifikacijama (NCCLS, 2003).

3.11.1. Bakterijski sojevi

U istraživanjima su korišćeni tipski laboratorijski sojevi mikroorganizama (ATCC - American Type Culture Collection): Gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) i *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) i Gram-pozitivne bakterije: *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Listeria monocytogenes* (ATCC15313) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

3.11.2. Mikrodiluciona metoda

Od prekonoćnih kultura ispitivanih bakterijskih sojeva koji su gajeni na hranljivom agaru, napravljene su bakterijske suspenzije u sterilnom fiziološkom ratstvoru (0,9% NaCl). Broj mikroorganizama je standardizovan turbidimetrijskom metodom na 0,5 McFarlanda ($1-1,5 \times 10^8$ CFU/ml, zavisno od roda bakterije). Početna koncentracija ispitivanih ekstrakta je napravljena u 30%-nom metanolu i to, za vrstu *M. pulegium* – ekstrakt biljaka iz prirode u koncentraciji od 100,50 mg/ml; ekstrakt biljaka odgajenih u uslovima *in vitro* u koncentraciji od 137,40 mg/ml, a za vrstu *M. croatica* – ekstrakt biljaka iz prirode u koncentraciji od 145,00 mg/ml; ekstrakt biljaka odgajenih u uslovima *in vitro* u koncentraciji od 81,00 mg/ml. Nakon toga je, u mikrotitarskoj ploči sa 96 bunarčića, unešeno po 100 μ l inokulisanog Muller-Hinton bujona (MHB) i napravljena je serija duplih razblaženja početne koncentracije ekstrakata, za *M. pulegium* u opsegu od 0,01-50,25 mg/ml (biljke iz prirode) i u opsegu od 0,02-68,7 mg/ml (biljke gajene *in vitro*), a za *M. croatica* u opsegu od 0,04-72,50 mg/ml (biljke iz prirode) i u opsegu od 0,02-40,50 mg/ml (biljke gajene *in vitro*). Finalni volumen u svakom bunarčiću je bio 100 μ l, a finalna koncentracija bakterija je bila 10^6 CFU/ml. Potom su mikrotitarske ploče inkubirane 24 h na 37 °C. Svi testovi rađeni su u triplicatu. Korišćene su dve kontrole rasta: jedna je sadržala inokulisanu hranljivu podlogu, a druga inokulisanu hranljivu podlogu sa serijom duplih razblaženja rastvarača metanola, u opsegu od 0,004 - 15,00 μ l/ml. Antibiotici: hloramfenikol, streptomycin i tetraciklin su korišćeni kao pozitivne kontrole, u opsegu koncentracija od 0,008 - 16,00 μ g/ml. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je koncentracija ekstrakta pri kojoj mikroorganizmi ne pokazuju vidljivi rast. Da bi se detektovao mikrobiološki rast u

svaki bunarčić je dodato po 20 μ l 0,5% vodenog rasvora TTC (2,3,5-trifenil tetrazolijumhlorida) koji boji porasle kolonije u crveno (Sartoratto i sar., 2004). Da bi se odredila minimalna baktericidna koncentracija (MBC), sadržaj iz svih bunarčića (u kojima nije bilo crveno obojenih kolonija) je prenešen na petri ploče sa Mueller-Hinton agarom (MHA), koje su zatim inkubirane 24h na 37 °C. Nakon inkubacije brojane su porasle kolonije bakterija. MBC se definiše kao najniža koncentracija ekstrakata pri kojoj je ubijeno 99,9% inokulisanih mikroorganizama

3.12. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Klijanci su na hranljivim podlogama gajeni 28 dana, a nakon toga su evidentirani eksplantati koji su reagovali na tretman i broj pupoljaka po eksplantatu. Zatim su mereni sledeći parametri: dužina pupoljaka, sveža i suva masa eksplantata. Procenat eksplantata koji je reagovao na tretman je izračunat tako što je broj eksplantata sa pupoljcima podeljen ukupnim brojem eksplantata postavljenih na tretman i pomnožen sa 100.

Svaki tretman obuhvatao je po 30 eksplantata, po 10 u jednoj teglici. Tretman je urađen u dva ponavljanja, ukupno po 60 eksplantata za svaki tretman.

Obrada podataka je urađena statističko-grafičkim paketom Statgraphics, verzija 5.0, procedura ANOVA i post-anova test LSD na nivou značajnosti $p < 0,05$. Statistička analiza je urađena za svaki parametar i u tabelama je predstavljena slovima. Statistički značajne razlike predstavljene su različitim slovima, ista slova označavaju da tih razlika nije bilo.

4. REZULTATI

4.1. PROPAGACIJA BILJAKA *M. pulegium* *in vitro*

4.1.1. Uspostavljanje kulture *in vitro* *M. pulegium*

Primarni eksplantati korišćeni za uspostavljanje kulture *in vitro* *M. pulegium* bili su segmenti stabla dužine 5 mm sa jednim nodusom i dva listića (Slika 3). Ovi segmenti su postavljeni na MS hranljivu podlogu bez regulatora rastenja. Na njima su prvi aksilarni pupoljci uočeni nakon sedam dana. U periodu od 4 - 6 nedelja na primarnim eksplantatima su se razvili brojni pupoljci (Slika 4). Na pojedinim primarnim eksplantatima, na nodusu, je došlo do spontanog formiranja korenova. Kada je pasaž produžen na 6 nedelja eksplantati su intenzivno cvetali (Slika 5). Za razliku od biljaka iz prirode, čiji su cvetovi roze boje, u kulturi su cvetovi bili beli.

U cilju postizanja multiplikacije, a izbegavanja reproduktivne faze, pasažiranje je vršeno na 4 nedelje i dobijeni su granati izdanci u vegetativnoj fazi. Sa primarnog eksplantata izolovani su segmenti stabla sa jednim nodusom i parom listića koji će se zbog pojednostavljenja dalje nazivati eksplantat. Proces multiplikacije je ponavljan dok se nije dobilo dovoljno izdanaka čiji su segmenti sa jednim nodusom korišćeni za ispitivanje uticaja fitohormona na formiranje aksilarnih pupoljaka.



Slika 3. Primarni eksplantat *M. pulegium*



Slika 4. Regenerisani izdanci *M. pulegium* na MS podlozi bez regulatora rastenja, nakon 4 nedelje.



Slika 5. Cvetovi na izdancima *M. pulegium in vitro*.

4.1.2. Indukcija i rastenje aksilarnih pupoljaka *M. pulegium*

Za indukciju aksilarnih pupoljaka osim hranljive podloge MS bez regulatora rastenja, korišćene su i podloge sa fitohormonima različitih koncentracija (Tab. 4). Nakon 4 nedelje gajenja u kulturi, praćeni su sledeći morfološki parametri: % eksplantata na kojima su se razvili pupoljci, broj aksilarnih pupoljaka po eksplantatu, dužina pupoljaka, sveža i suva masa izdanaka.

Na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja na svim eksplantatima (100%) razvili su se brojni aksilarni pupoljci (Tab. 6). Takođe, razviće aksilarnih pupoljaka na svim eksplantatima zabeleženo je na podlogama sa visokim koncentracijama citokinina BA (3, 10, 30 μM) bez ili sa 0,57 μM IAA i na podlogama sa kombinacijom visokih koncentracija kinetina (10, 30 μM) i 0,57 μM IAA. Kada je hranljiva podloga sadržala samo auksin (0,57 μM IAA) 70% eksplantata je reagovalo na tretman i na njima je uočeno formiranje aksilarnih pupoljaka. Najmanji procenat eksplantata sa razvijenim pupoljcima, 58,3%, zabeležen je na podlozi sa 1 μM BA (Tab. 6).

Tokom četiri nedelje gajenja u kulturi *in vitro* na eksplantatima, na svakom nodusu, u pazuhu listova su se razvijali aksilarni pupoljci koji su se zatim izduživali u izdanke. Izdanci su rasli, izduživali se i granali, pa je tako eksplantat poprimao žbunastu formu koja karakteriše ovu vrstu i u prirodi.

Na eksplantatima gajenim na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja prosečno je formirano 15,9 pupoljaka. Na podlogama sa niskim koncentracijama korišćenih regulatora rastenja broj pupoljaka po eksplantatu bio je manji ili približno jednak broju pupoljaka na kontrolnim eksplantatima. Statistički značajno povećanje broja pupoljaka u odnosu na kontrolu zabeleženo je kod eksplantata gajenih na podlogama koje sadrže: 3 μM BA, 10 μM BA i 0,57 μM IAA, 1 μM kinetina, 10 μM kinetina i 0,57 μM IAA. Najveći prosečan broj pupoljaka 19,42 formiran je na eksplantatima koji su rasli na MS hranljivoj podlozi sa 3 μM BA (Tab. 6). Na slici 6 prikazana je hranljiva podloga na kojoj su eksplantati sa razvijenim izdancima i na njima aksilarnim pupoljcima. Izdvojen eksplantat je žbunaste forme koja potiče od velikog broja formiranih izdanaka i aksilarnih pupoljaka. Najmanji prosečni broj pupoljaka po eksplantatu (11,7) zabeležen je kod eksplantata gajenih na podlozi sa 0,3 μM BA.

Tabela 6. Uticaj regulatora rastenja na indukciju aksilarnih pupoljaka, njihovu dužinu, svežu i suhu masu

Regulatori rastenja (μM)	Eksp. sa pup (%)	Broj pupoljaka po eksplantatu	Dužina pupoljaka (mm)	Sveža masa (g)	Suva masa (g)
-	100,0	$15,90 \pm 1,05^{\text{defgh}}$	$8,56 \pm 0,29^{\text{bcdefg}}$	$0,173 \pm 0,017^{\text{cdef}}$	$0,0202 \pm 0,0014^{\text{bcde}}$
0,1 BA	93,3	$12,86 \pm 0,79^{\text{ab}}$	$7,70 \pm 0,28^{\text{ab}}$	$0,143 \pm 0,008^{\text{abc}}$	$0,0167 \pm 0,0081^{\text{ab}}$
0,3 BA	66,7	$11,70 \pm 1,29^{\text{a}}$	$8,67 \pm 0,45^{\text{cdefgh}}$	$0,131 \pm 0,011^{\text{ab}}$	$0,0170 \pm 0,0114^{\text{ab}}$
1 BA	58,3	$16,43 \pm 1,10^{\text{efgh}}$	$9,00 \pm 0,48^{\text{defghi}}$	$0,213 \pm 0,012^{\text{gh}}$	$0,0221 \pm 0,0116^{\text{cdef}}$
3 BA	100,0	$19,42 \pm 0,92^{\text{i}}$	$9,31 \pm 0,30^{\text{ghij}}$	$0,227 \pm 0,012^{\text{hi}}$	$0,0240 \pm 0,0120^{\text{efg}}$
10 BA	100,0	$16,62 \pm 0,83^{\text{fgh}}$	$9,75 \pm 0,31^{\text{ijkl}}$	$0,310 \pm 0,011^{\text{m}}$	$0,0312 \pm 0,0111^{\text{j}}$
30 BA	100,0	$15,62 \pm 0,80^{\text{cdefg}}$	$9,11 \pm 0,22^{\text{fghij}}$	$0,264 \pm 0,015^{\text{jk}}$	$0,0251 \pm 0,0014^{\text{fgh}}$
0,57 IAA	70,0	$16,21 \pm 1,40^{\text{efgh}}$	$8,15 \pm 0,35^{\text{abcde}}$	$0,159 \pm 0,013^{\text{bcde}}$	$0,0185 \pm 0,0016^{\text{abcd}}$
IAA 0,1BA	93,3	$14,68 \pm 1,42^{\text{abcdef}}$	$7,59 \pm 0,32^{\text{a}}$	$0,138 \pm 0,011^{\text{ab}}$	$0,0151 \pm 0,0011^{\text{a}}$
IAA 0,3BA	76,7	$12,87 \pm 0,85^{\text{abc}}$	$10,58 \pm 0,51^{\text{l}}$	$0,185 \pm 0,010^{\text{defg}}$	$0,0215 \pm 0,0015^{\text{cdef}}$
IAA 1 BA	96,7	$14,66 \pm 0,82^{\text{abcdef}}$	$9,07 \pm 0,34^{\text{fghij}}$	$0,203 \pm 0,007^{\text{fgh}}$	$0,0205 \pm 0,0008^{\text{bcde}}$
IAA 3 BA	100,0	$17,33 \pm 0,98^{\text{fghi}}$	$10,13 \pm 0,32^{\text{kl}}$	$0,271 \pm 0,013^{\text{jk}}$	$0,0279 \pm 0,0013^{\text{ghij}}$
IAA 10BA	100,0	$18,19 \pm 1,11^{\text{ghi}}$	$9,94 \pm 0,28^{\text{ikl}}$	$0,303 \pm 0,016^{\text{lm}}$	$0,0302 \pm 0,0158^{\text{ij}}$
IAA 30 BA	100,0	$15,62 \pm 0,89^{\text{cdefg}}$	$8,50 \pm 0,23^{\text{bcdef}}$	$0,274 \pm 0,015^{\text{jkl}}$	$0,0269 \pm 0,0146^{\text{ghi}}$
0,1 kin	80,0	$14,52 \pm 1,55^{\text{abcdef}}$	$7,94 \pm 0,33^{\text{abc}}$	$0,161 \pm 0,014^{\text{bcde}}$	$0,0179 \pm 0,0015^{\text{abcd}}$
0,3 kin	75,0	$12,44 \pm 1,27^{\text{ab}}$	$7,51 \pm 0,32^{\text{a}}$	$0,118 \pm 0,010^{\text{a}}$	$0,0144 \pm 0,0010^{\text{a}}$
1 kin	80,0	$18,75 \pm 1,32^{\text{hi}}$	$8,06 \pm 0,30^{\text{abcd}}$	$0,193 \pm 0,011^{\text{defg}}$	$0,0220 \pm 0,0013^{\text{def}}$
3 kin	68,3	$13,22 \pm 1,32^{\text{abcde}}$	$7,46 \pm 0,34^{\text{a}}$	$0,134 \pm 0,010^{\text{ab}}$	$0,0150 \pm 0,0013^{\text{a}}$
10 kin	88,3	$12,51 \pm 0,94^{\text{ab}}$	$9,39 \pm 0,39^{\text{ghijk}}$	$0,159 \pm 0,010^{\text{bcd}}$	$0,0169 \pm 0,0010^{\text{ab}}$
30 kin	85,0	$16,87 \pm 0,88^{\text{fghi}}$	$8,78 \pm 0,27^{\text{defgh}}$	$0,228 \pm 0,010^{\text{hi}}$	$0,0214 \pm 0,0010^{\text{cdef}}$
IAA 0,1 kin	81,7	$14,80 \pm 0,88^{\text{abcdef}}$	$8,68 \pm 0,34^{\text{defgh}}$	$0,181 \pm 0,010^{\text{defg}}$	$0,0222 \pm 0,0013^{\text{def}}$
IAA 0,3 kin	93,3	$16,07 \pm 0,97^{\text{efgh}}$	$7,73 \pm 0,29^{\text{ab}}$	$0,162 \pm 0,009^{\text{bcde}}$	$0,0197 \pm 0,0012^{\text{bcd}}$

IAA 1 kin	83,3	15,16 ± 0,89 ^{bcdef}	9,70 ± 0,39 ^{hijkl}	0,197 ± 0,008 ^{gh}	0,0224 ± 0,0010 ^{def}
IAA 3 kin	83,3	13,14 ± 0,68 ^{abcd}	9,10 ± 0,35 ^{fghij}	0,194 ± 0,011 ^{efg}	0,0201 ± 0,0010 ^{bcde}
IAA 10 kin	100,0	18,00 ± 1,05 ^{ghi}	9,02 ± 0,27 ^{efghi}	0,282 ± 0,020 ^{klm}	0,0282 ± 0,0017 ^{hij}
IAA 30 kin	100,0	16,78 ± 0,85 ^{fghi}	9,06 ± 0,25 ^{fghi}	0,251 ± 0,010 ^{ij}	0,0299 ± 0,0043 ^{ij}

Rezultati predstavljaju srednju vrednost iz nezavisnih eksperimenata $n = 60 \pm SE$. Statistički značajnu razliku ne pokazuju vrednosti označene istim slovom ($p \leq 0,05$).



Slika 6. Aksilarni pupoljci na eksplantatima *M. pulegium* gajenim na podlozi sa 3 μ M BA

Na pojedinim izdancima gajenim na podlogama sa 3 μ M kinetina i 0,57 μ M IAA odnosno 10 μ M kinetina i 0,57 μ M IAA došlo je do formiranja adventivnih pupoljaka na licu lista uz sam obod lista koji je bio u kontaktu sa podlogom (Slika 7).



Slika 7. Adventivni pupoljci *M. pulegium* formirani na listu izdanka gajenog na podlozi sa 3 μ M Kin i 0,57 μ M IAA

U osnovi pojedinih eksplantata koji su rasli na podlozi sa 10 μM kinetina i 0,57 μM IAA odnosno 30 μM kinetina i 0,57 μM IAA, kao i na podlogama sa auksinom i višim koncentracijama BA (10 μM i 30 μM) formirano je kalusno tkivo zelene boje i brojni adventivni pupoljci (Slika 8). Pojedini eksplantati gajeni na podlogama sa 3, 10 ili 30 μM kinetina imali su dobro razvijen koren.



Slika 8. Kalusno tkivo i adventivni pupoljci u osnovi eksplantata *M. pulegium* na podlozi sa 10 μM kinetina i 0,57 μM IAA

Maksimalna prosečna dužina izdanaka, 10,58 mm, izmerena je kod eksplantata koji su rasli na hranljivoj podlozi sa 0,3 μM BA i 0,57 μM (Tab. 6, Slika 9). Ona je za 30% veća od dužine pupoljaka eksplantata sa kontrolne podloge, odnosno za 25% u odnosu na dužinu pupoljaka eksplantata sa podloge koja sadrži samo IAA. Prosečno najkraći pupoljci (7,46 mm), izmereni su na eksplantatima koji su rasli na podlozi sa 3 μM kinetina.

Izdanci eksplantata koji su rasli na podlogama sa niskim koncentracijama citokinina (0,1 μM BA i 0,3 μM kinetina) bez ili sa auksinom bili su značajno kraći od onih koji su rasli bez prisustva regulatora rastenja.



Slika 9. Aksilarni izdanci *M. pulegium* na podlozi sa 0,3 μM BA i 0,57 μM IAA

Nakon 4 nedelje gajenja u kulturi *in vitro* merena je biomasa eksplantata koji su se razvijali na 26 različitih podloga. Merena je sveža i suva masa eksplantata. Sveži eksplantati *M. pulegium* po uklanjanju sa podloge veoma brzo, za par minuta, na vazduhu gube vigor i venu, pa je veoma važno meriti ih odmah po uzimanju iz kulture, kako bi vrednost izmerene sveže mase bila realna. Najveći prinos biomase eksplantata ostvaren je na podlozi sa 10 μM BA. Na toj podlozi su izmerene najveće prosečne vrednosti sveže (0,310 g) i suve (0,0312 g) mase eksplantata (Tab. 6, Slika 10). Najniže prosečne vrednosti sveže i suve mase zabeležene su kod eksplantata koji su rasli na podlogama sa 0,3 μM kinetina.



Slika 10. *M. pulegium* na hranljivoj podlozi sa 10 μM BA

4.1.3. Ožiljavanje aksilarnih izdanaka *M. pulegium in vitro*

Aksilarni izdanci *M. pulegium* dugi 15-20 mm koji su se formirali na eksplantatima gajenim na MS podlozi bez regulatora rastenja, postavljeni su na 12 različitih hranljivih podloga za ožiljavanje. Podloge su sadržale jedan od tri auksina (IAA, NAA, IBA) u koncentracijama 0,1, 0,2, 0,3 i 1 mg/l. Sve podloge sadržale su polovinu MS makro i mikrosoli (MS/2).

Na kontrolnoj podlozi (MS/2 bez fitohormona) ožiljeno je 28,33% aksilarnih izdanaka (Tab. 7). Najveći procenat ožiljavanja zabeležen je na podlozi sa 1 mg/l IAA gde je ožiljeno 54% aksilarnih izdanaka. Najmanje eksplantata je ožiljeno na podlozi koja je sadržala 0,2 µg/l odnosno 1 µg/l IBA, svega 8,33%. Procenat ožiljavanja je bio veći na podlogama sa IAA nego na kontrolnoj i podlogama sa NAA ili IBA.

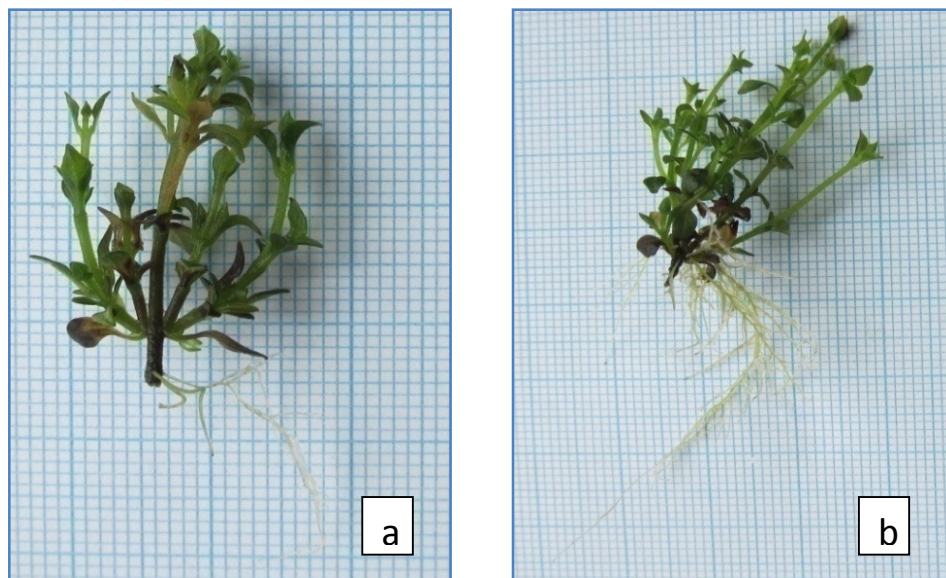
Na podlogama koje sadrže IAA, procenat ožiljavanja izdanaka je približno ujednačen na nižim koncentracijama i nešto veći na najvišoj korišćenoj koncentraciji. Procenat ožiljavanja aksilarnih izdanaka na podlogama koje sadrže NAA, povećava se sa porastom koncentracije do 0,3 µg/l, a potom blago opada. I pored toga podloge koje su sadržale više koncentracije NAA bile su efikasnije u indukciji korenova na aksilarnim pupoljcima nego podloga MS/2 bez fitohormona. Ožiljavanje aksilarnih pupoljaka na svim podlogama koje sadrže IBA bilo je slabije nego na kontrolnoj podlozi bez auksina.

Nakon 5 nedelja na induktivnim podlogama merena je dužina korena svih ožiljenih izdanaka. Prosečna dužina korena izdanaka gajenih na podlozi bez regulatora rastenja bila je 13,94 mm (Tab. 7, Slika 11 a). Najveću prosečnu dužinu korenova od 31,42 mm imali su izdanci gajeni na podlozi sa 1 µg/l IAA (Slika 11 b). Na toj podlozi je zabeležen i izdanak sa najdužim izmerenim korenom, dugim 35,77 mm. Izdanci sa ove podloge imali su duge, najčešće granate, svetlo-smeđe korenove. U donjem delu eksplantata stabljika je zadebljala, blago odrvenjena. Donji listovi koji su se oslanjali na podlogu bili su nekrotični, a formirani aksilarni izdanci imali su izdužene noduse i relativno sitnije listove. Pri istoj koncentraciji 1 µg/l NAA, odnosno IBA, korenovi su bili znatno kraći (11,19 mm, odnosno 12,24 mm).

Tabela 7. Ožiljavanje izdanaka *M. pulegium* na MS/2 hranljivoj podlozi sa IAA, NAA i IBA

auksin (mg/L)	% ožiljavanja	Prosečna dužina korena (mm)	Izmeren najkraći koren (mm)	Izmeren najduži koren (mm)
-	28,33	13,94 ± 2,02 ^{cde}	8,25	19,62
0,1 IAA	45,00	15,54 ± 3,16 ^{cde}	10,02	21,06
0,2 IAA	44,00	21,31 ± 2,07 ^{de}	15,31	25,31
0,3 IAA	44,00	22,44 ± 2,81 ^e	17,45	27,44
1 IAA	54,00	31,42 ± 4,13^f	27,07	35,77
0,1 NAA	16,67	6,03 ± 0,30 ^{ab}	1,38	13,44
0,2 NAA	25,00	11,25 ± 0,98 ^{abc}	5,20	17,30
0,3 NAA	50,00	5,93 ± 1,09 ^a	1,65	10,21
1 NAA	43,33	11,19 ± 1,91 ^{abc}	6,60	15,79
0,1 IBA	20,00	9,74 ± 2,55 ^{abc}	2,33	17,16
0,2 IBA	8,33	11,49 ± 1,24 ^{abcde}	1,01	21,98
0,3 IBA	10,00	13,21 ± 3,72 ^{bcde}	3,64	22,78
1 IBA	8,33	12,24 ± 2,13 ^{abcde}	1,76	22,72

Rezultati predstavljaju srednju vrednost iz nezavisnih eksperimenata $n = 60 \pm SE$. Statistički značajnu razliku ne pokazuju vrednosti označene istim slovom ($p \leq 0,05$).



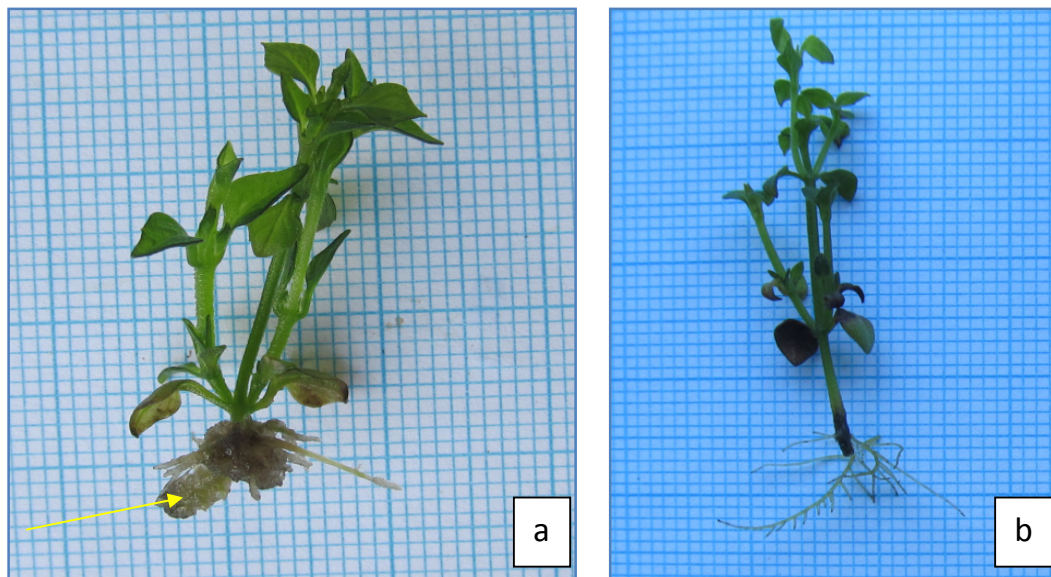
Slika 11. Ožiljeni izdanak *M. pulegium* na podlozi: a) bez regulatora rastenja; b) sa 1 $\mu\text{g/l}$ IAA

Prosečno najkraće korenove od 5,93 mm, odnosno 6,03 mm imali su izdanci gajeni na podlozi sa 0,3 $\mu\text{g/l}$ NAA, odnosno 0,1 $\mu\text{g/l}$ NAA (Tab. 7, Slika 12). Ovi izdanci imali su svetle, beličaste, negranate, približno ujednačeno kratke korenove formirane u zadebljanoj bazi izdanka i gusto zbijene izdanke sa izduženim nodusima.



Slika 12. Ožiljeni izdanak *M. pulegium* na podlozi MS/2 sa 0,1 $\mu\text{g/l}$ NAA

Svi ožiljeni izdanci koji su gajeni na podlogama sa NAA ili IBA imali su kraće korenove nego pupoljci koji su rasli na kontrolnoj MS/2 podlozi (Tab. 7). Ožiljeni izdanci na podlozi sa 1 mg/l NAA imali su u osnovi formiran kalus smeđe boje, a korenovi smeđe boje formirali su se na kalusu i iznad kalusa a ispod prvog para listova (Slika 13a). Na višim koncentracijama IBA 0,3 mg/l i 1 mg/l izdanci su imali kratko granate, svetlo-smeđe korenove (Slika 13b).



Slika 13. Ožiljeni aksilarni izdanak *M. pulegium* na podlozi sa: a) 1 mg/l NAA; b) 1 mg/l IBA

4.1.4. Aklimatizacija biljaka *M. pulegium*

Za aklimatizaciju su odabrani ožiljeni izdanci, odnosno biljčice *Micromeria pulegium* nakon 5 nedelja gajenja u kulturi. Izuzev biljaka na kojima se formirao kalus, sve ostale biljke sa adventivnim korenovima, bez obzira na kojoj su podlozi gajene posađene su u plastične čašice sa sterilisanom zemljom. Korenovi koji su formirani na izdancima u uslovima *in vitro* veoma su važni u najranijem periodu razvoja biljke u *ex vitro* uslovima. Po razvijanju novih listova, biljke se mogu smatrati aklimatizovanim, pa je njihovo gajenje moguće dalje u staklari i na otvorenom. Tokom perioda od 4 nedelje rasta u *ex vitro* uslovima 78% biljaka je aklimatizovano (Slike 14 i 15).



Slika 14. Biljke *M. pulegium* propagirane *in vitro* na početku aklimatizacije



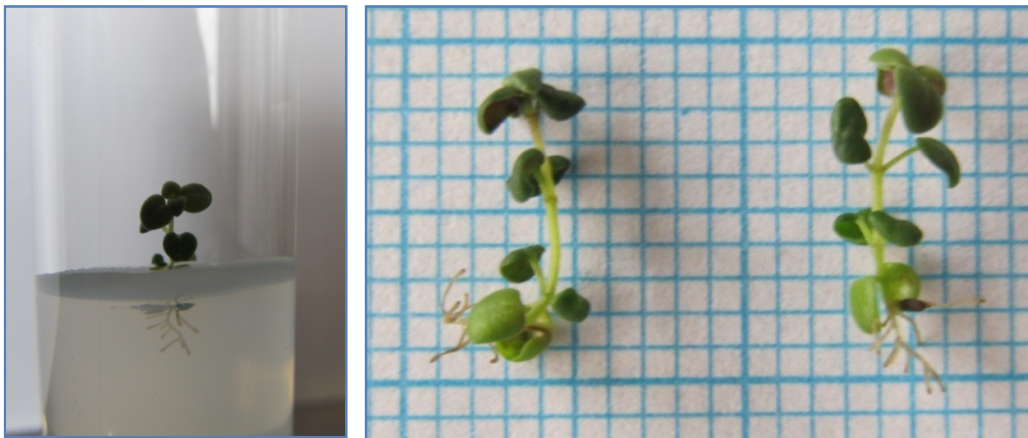
Slika 15. Biljke *M. pulegium* dobijene *in vitro* u završnoj fazi aklimatizacije

4.2. PROPAGACIJA BILJAKA *M. croatica* *in vitro*

4.2.1. Uspostavljanje *in vitro* kulture *M. croatica*

Segmenti stabla dužine 4 mm sa jednim nodusom i dva listića uzeti sa biljaka *M. croatica* iz prirode nisu se razvijali na MS hranljivoj podlozi. Zato je u jesen sakupljeno seme, sterilisano i postavljeno na MS hranljivu podlogu. Semena su isklijala u zdrave biljčice (Slika 16). Klijavost semena bila je 89%.

Nakon 4 nedelje sa klijanaca, dugih oko 10 mm, za eksplantate su uzeti segmenti dugi oko 4 mm sa jednim nodusom i dva listića i preneti na svežu MS podlogu. Izabrani su nodusi formirani ispod vršnog pupoljka. Proces multiplikacije je nastavljen dok se nije obezbedilo dovoljno izdanaka sa kojih su korišćeni segmenti sa jednim nodusom za ispitivanje uticaja fitohormona na formiranje aksilarnih pupoljaka.



Slika 16. Klijanci *M. croatica* nakon 4 nedelje na MS podlozi

4.2.2. Indukcija i rastenje aksilarnih pupoljaka *M. croatica*

Za indukciju i rastenje aksilarnih pupoljaka korišćena je MS hranljiva podloga bez regulatora rastenja i podloge koje su sadržale fitohormone u različitim koncentracijama i kombinacijama (Tab. 8).

Tabela 8. Uticaj regulatora rastenja na indukciju aksilarnih pupoljaka *M. croatica*, njihovu dužinu, svežu i suhu masu

Regulatori rastenja (μM)	Eks. sa pup (%)	Broj pupoljaka po eksplantatu	Dužina pupoljaka (mm)	Sveža masa (g)	Suva masa (g)
-	56,7	$9,35 \pm 1,28^{\text{ghjk}}$	$8,02 \pm 0,36^{\text{jk}}$	$0,103 \pm 0,021^{\text{jk}}$	$0,0091 \pm 0,0014^{\text{fghijk}}$
0,1 BA	65,0	$5,56 \pm 0,53^{\text{abc}}$	$7,26 \pm 0,40^{\text{cdefghi}}$	$0,042 \pm 0,006^{\text{ab}}$	$0,0055 \pm 0,0006^{\text{abc}}$
0,3 BA	68,3	$6,85 \pm 0,72^{\text{abcde}}$	$7,41 \pm 0,34^{\text{defghij}}$	$0,060 \pm 0,008^{\text{abcdef}}$	$0,0065 \pm 0,0007^{\text{abcde}}$
1 BA	85,0	$8,55 \pm 0,77^{\text{fghij}}$	$7,12 \pm 0,28^{\text{cdefg}}$	$0,073 \pm 0,009^{\text{cdefghi}}$	$0,0088 \pm 0,0013^{\text{fghij}}$
3 BA	68,3	$9,88 \pm 0,82^{\text{ijk}}$	$8,14 \pm 0,32^{\text{ijk}}$	$0,088 \pm 0,010^{\text{ghij}}$	$0,0095 \pm 0,0009^{\text{ijk}}$
10 BA	65,0	$9,29 \pm 0,89^{\text{ghijk}}$	$6,72 \pm 0,31^{\text{cd}}$	$0,083 \pm 0,008^{\text{defghi}}$	$0,0088 \pm 0,0007^{\text{fghij}}$
30 BA	58,3	$8,66 \pm 0,98^{\text{fghijk}}$	$4,97 \pm 0,19^{\text{a}}$	$0,085 \pm 0,010^{\text{efghi}}$	$0,0084 \pm 0,0009^{\text{efghij}}$
0,57 IAA	76,7	$5,52 \pm 0,46^{\text{ab}}$	$7,96 \pm 0,33^{\text{hijk}}$	$0,036 \pm 0,030^{\text{a}}$	$0,0050 \pm 0,0004^{\text{a}}$
IAA 0,1 BA	70,0	$7,19 \pm 0,65^{\text{bcdef}}$	$7,61 \pm 0,34^{\text{fghijk}}$	$0,064 \pm 0,007^{\text{bcdefg}}$	$0,0086 \pm 0,0006^{\text{efghij}}$
IAA 0,3 BA	73,3	$7,64 \pm 0,55^{\text{efgh}}$	$7,85 \pm 0,28^{\text{ghijk}}$	$0,059 \pm 0,005^{\text{abcde}}$	$0,0072 \pm 0,0005^{\text{bcdefgh}}$
IAA 1 BA	75,0	$7,98 \pm 0,61^{\text{fghi}}$	$7,64 \pm 0,26^{\text{fghijk}}$	$0,085 \pm 0,007^{\text{efghi}}$	$0,0101 \pm 0,0007^{\text{jk}}$
IAA 3 BA	73,3	$6,64 \pm 0,39^{\text{abcde}}$	$7,90 \pm 0,31^{\text{hijk}}$	$0,058 \pm 0,004^{\text{abcd}}$	$0,0073 \pm 0,0004^{\text{cdefgh}}$
IAA 10 BA	80,0	$10,08 \pm 0,90^{\text{jk}}$	$6,88 \pm 0,22^{\text{cde}}$	$0,108 \pm 0,009^{\text{jk}}$	$0,0110 \pm 0,0009^{\text{k}}$
IAA 30 BA	55,0	$9,45 \pm 1,03^{\text{hijk}}$	$5,12 \pm 0,20^{\text{a}}$	$0,106 \pm 0,016^{\text{ijk}}$	$0,0087 \pm 0,0011^{\text{efghij}}$
0,1 kin	65,0	$10,33 \pm 1,13^{\text{k}}$	$7,03 \pm 0,27^{\text{cdef}}$	$0,092 \pm 0,014^{\text{hijk}}$	$0,0093 \pm 0,0010^{\text{hijk}}$
0,3 kin	70,0	$10,33 \pm 0,95^{\text{k}}$	$8,29 \pm 0,31^{\text{k}}$	$0,114 \pm 0,019^{\text{k}}$	$0,0092 \pm 0,0009^{\text{ghijk}}$
1 kin	78,3	$10,34 \pm 0,81^{\text{k}}$	$7,88 \pm 0,25^{\text{hijk}}$	$0,092 \pm 0,009^{\text{hijk}}$	$0,0088 \pm 0,0007^{\text{fghij}}$
3 kin	85,0	$9,61 \pm 0,82^{\text{ijk}}$	$7,58 \pm 0,27^{\text{fg76hij}}$	$0,082 \pm 0,008^{\text{cdefghi}}$	$0,0086 \pm 0,0008^{\text{efghij}}$
10 kin	61,7	$7,32 \pm 0,66^{\text{bcdefg}}$	$6,34 \pm 0,26^{\text{bc}}$	$0,057 \pm 0,005^{\text{abcd}}$	$0,0062 \pm 0,0006^{\text{abcd}}$
30 kin	51,7	$8,00 \pm 0,98^{\text{fghi}}$	$5,64 \pm 0,28^{\text{ab}}$	$0,063 \pm 0,009^{\text{bcdefg}}$	$0,0069 \pm 0,0008^{\text{abcdef}}$
IAA 0,1 kin	78,3	$7,40 \pm 0,63^{\text{cdefg}}$	$8,23 \pm 0,32^{\text{jk}}$	$0,059 \pm 0,007^{\text{abcd}}$	$0,0072 \pm 0,0007^{\text{bcdefg}}$
IAA 0,3 kin	75,0	$5,76 \pm 0,46^{\text{abcd}}$	$7,83 \pm 0,37^{\text{fghijk}}$	$0,054 \pm 0,005^{\text{abc}}$	$0,0070 \pm 0,0006^{\text{abcdef}}$

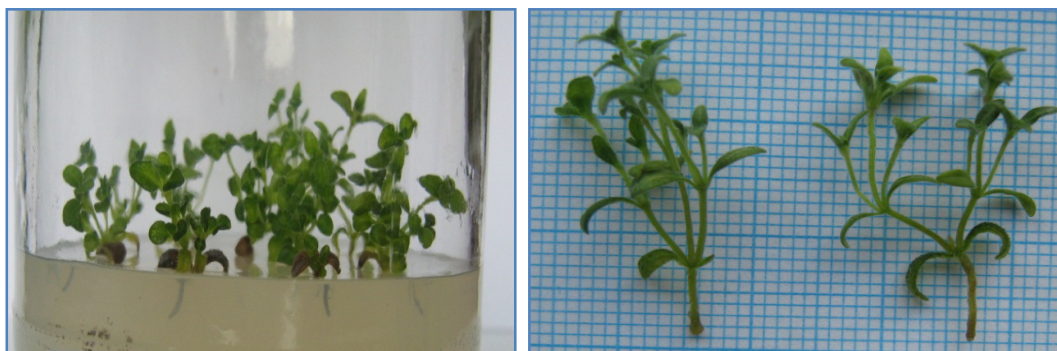
IAA 1 kin	90,0	7,61 ± 0,65 ^{efgh}	7,54 ± 0,26 ^{efghij}	0,074 ± 0,013 ^{cdefgh}	0,0084 ± 0,0007 ^{efghij}
IAA 3 kin	75,0	5,76 ± 0,40 ^{abcd}	7,63 ± 0,32 ^{efghijk}	0,046 ± 0,003 ^{ab}	0,0069 ± 0,0005 ^{abcdef}
IAA 10 kin	80,0	7,02 ± 0,61 ^{bcd}	7,19 ± 0,27 ^{cdefgh}	0,053 ± 0,005 ^{abc}	0,0073 ± 0,0006 ^{cdefgh}
IAA 30 kin	81,7	5,02 ± 0,47 ^a	5,22 ± 0,23 ^a	0,040 ± 0,004 ^{ab}	0,0051 ± 0,0004 ^{ab}

Rezultati predstavljaju srednju vrednost iz nezavisnih eksperimenata $n = 60 \pm SE$. Statistički značajnu razliku ne pokazuju vrednosti označene istim slovom ($p \leq 0,05$).

Nakon sedam dana, uočeno je formiranje aksilarnih pupoljaka. Morfološki parametri (% eksplantata na kojima su se razvili pupoljci, broj pupoljaka po eksplantatu, dužina izdanaka, sveža i suva masa eksplantata) evidentirani nakon 4 nedelje rasta u kulturi, dati su u tabeli 8. Na podlozi bez regulatora rastenja 56,7% postavljenih eksplantata je formiralo aksilarne pupoljke. Na svim korišćenim podlogama, osim podloge sa 30 μM BA i 0,57 μM IAA i podloge sa 30 μM kinetina, procenat eksplantata sa aksilarnim pupoljcima bio je veći nego na podlozi bez regulatora rastenja (Tab. 8). Najviše eksplantata sa pupoljcima, 85%, zabeleženo je na podlozi sa 1 μM BA.

Na eksplantatima koji su rasli na podlozi bez regulatora rastenja formirano je u proseku 9,35 pupoljaka (Tab. 8). Izdanci na ovoj podlozi imali su izdužene internodije, a listovi koji su bili u kontaktu sa podlogom su nekrozirali.

Najveći prosečan broj pupoljaka, 10,3 imali su eksplantati na podlogama sa 0,1, 0,3 i 1 μM kinetina. Izdanci sa ovih podloga su bili razgranati, zelene boje, prilično ujednačenog rasta. Imali su dugačke internodije sa velikim brojem pupoljaka. Listovi su bili zeleni, bez znakova nekroze (Slika 17).



Slika 17. Izdanci *M. croatica* na podlozi sa 0,3 μM kinetina, nakon 4 nedelje.

Prosečno najmanji broj aksilarnih pupoljaka 5,02 formiran je na eksplantatima gajenim na podlozi sa 30 μM kinetina i 0,57 μM IAA. Izdanci gajeni na ovoj podlozi bili su vrlo skraćenih internodija sa zbijenim pupoljcima.

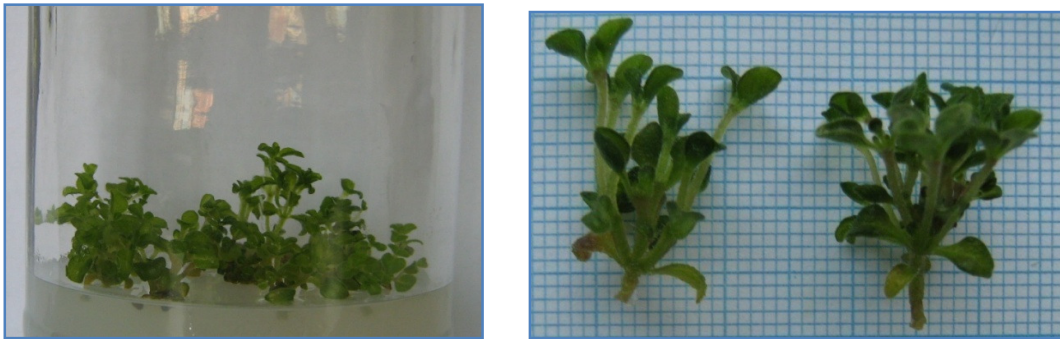
Prosečan broj pupoljaka na podlogama koje sadrže samo kinetin, veći je od prosečnog broja pupoljaka na kombinovanim podlogama sa kinetinom i IAA (Tab. 8). Analizirajući broj aksilarnih pupoljaka po eksplantatu, može se primetiti da osim koncentracije i priroda citokinina utiče na formiranje aksilarnih pupoljaka.

Prosečna srednja vrednost dužine aksilarnih pupoljaka na izdancima na podlozi bez fitohormona bila je 8,02 mm, a na podlozi sa IAA 7,26 mm (Tab. 8). Najveća srednja vrednost dužine izdanaka od 8,29 mm izmerena je kod eksplantata gajenih na podlozi sa 0,3 μM kinetina, i ona se nije statistički značajno razlikovala od rezultata sa kontrolne podloge (Tab. 8, Slika 17). Prosečno najkraće izdanke 4,97 mm imali su eksplantati koji su se razvijali na podlozi sa 30 μM BA. Ovi eksplantati su bili vrlo kratki, žbunasti, izrazito kratkih internodija, sa svetlo zelenim listovima.

Masa eksplantata merena je dva puta. Prvi put odmah po uzorkovanju sa hranljive podloge, a potom nakon sušenja, čime su dobijene vrednosti sveže i suve biomase.

Sveža masa eksplantata koji su rasli na podlozi bez regulatora rastenja bila je 0,103 g, dok je suva masa bila 0,0091 g. Eksplantati gajeni na podlozi sa IAA imali su najmanji prinos sveže 0,036 g, i suve mase 0,0050 g (Tab. 8). Njihova masa bila je upola manja od mase eksplantata sa podloge bez regulatora rastenja.

Najveći prosečni prinos sveže mase 0,114 g imali su eksplantati na podlozi sa 0,3 μM kinetina. Na toj podlozi izdanci su bili najbujniji (Slika 17). Prosečno najveći prinos suve biomase 0,011 g imali su izdanci na kombinovanoj podlozi sa 10 μM BA i 0,57 μM IAA. Na izdancima sa ove podloge formiran je veliki broj (10,08) relativno kratkih pupoljaka (6,88 mm) što je doprinelo njihovoj velikoj biomasi (Slika 18).



Slika 18. Izdanci *M. croatica* na podlozi sa IAA i 10 μ M BA nakon 4 nedelje

4.2.3. Ožiljavanje aksilarnih izdanaka *M. croatica in vitro*

Aksilarni pupoljci *M. croatica* dugi 10-15 mm su postavljani na MS/2 podloge sa različitim koncentracijama auksina kako bi se ispitao uticaj fitohormona na ožiljavanje. Na podlozi MS/2 bez auksina, ožililo se 73,33% aksilarnih pupoljaka (Tab. 9). Najviše, 81,67% aksilarnih izdanaka se ožilio na podlozi MS/2 sa 0,3 mg/l IAA, što je više nego na kontrolnoj podlozi. Najmanje ožiljenih aksilarnih pupoljaka 45% bilo je na podlozi MS/2 sa 1 mg/l IBA. Aksilarni izdanci na podlogama sa NAA ili IBA ožilili su se u manjem procentu nego izdanci na podlozi bez auksina. Takođe je odgovor bio slabiji i na MS/2 podlogama sa 0,1 i 1 mg/l IAA. Proces ožiljavanja aksilarnih pupoljaka stimuliše IAA i to u relativno niskim koncentracijama (0,2 i 0,3 mg/l). Auksini NAA i IBA nisu stimulisali ožiljavanje *M. croatica*.

Izdanci koji su se ožilili na MS/2 podlozi sa IAA imali su značajno duže korenove od izdanaka gajenih na podlozi MS/2 bez auksina. Suprotno tome, izdanci ožiljeni na podlogama sa NAA imali su značajno kraće korenove od kontrolnih izdanaka. Kraće korenove imali su i izdanci ožiljeni na podlogama sa različitim koncentracijama IBA. IBA a naročito NAA utiče na smanjeni rast korena za razliku od IAA koji stimuliše izduživanje korena.

Dužina korenova izdanaka koji su se ožilili na MS/2 podlozi bez auksina bila je 7,45 mm (Tabela 9, slika 19 a). U bazi izdanaka formirali su se duži tamni korenovi, a sa nodusa su se pružali kraći, beličasti korenovi.

Tabela 9. Ožiljavanje izdanaka *M. croatica* na MS/2 hranljivoj podlozi sa IAA, NAA i IBA

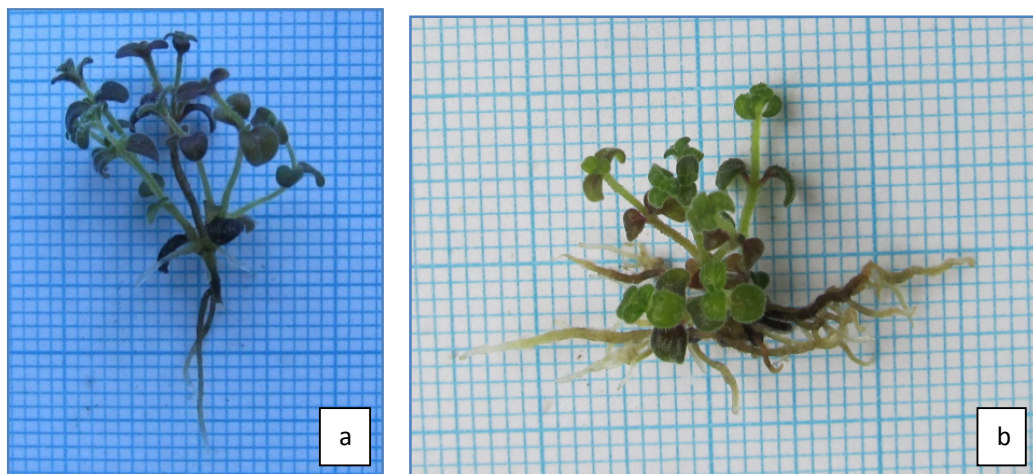
auksin (mg/L)	% ožiljavanja	Prosečna dužina korena (mm)	Izmeren najkraći koren (mm)	Izmeren najduži koren (mm)
-	73,33	$7,45 \pm 0,58^{cd}$	6,51	8,39
0,1 IAA	60,00	$8,13 \pm 0,54^{de}$	7,09	9,16
0,2 IAA	76,67	$9,27 \pm 0,58^{ef}$	8,35	10,19
0,3 IAA	81,67	$10,57 \pm 0,47^g$	9,67	11,47
1 IAA	55,00	$10,07 \pm 0,65^{fg}$	8,97	11,17
0,1 NAA	51,67	$4,91 \pm 0,46^a$	3,78	6,05
0,2 NAA	60,00	$5,49 \pm 0,33^{ab}$	4,44	6,54
0,3 NAA	60,00	$5,35 \pm 0,33^{ab}$	4,31	6,39
1 NAA	46,67	$5,31 \pm 0,47^{ab}$	4,12	6,51
0,1 IBA	53,33	$6,73 \pm 0,62^{bcd}$	5,63	7,83
0,2 IBA	60,00	$6,36 \pm 0,61^{abc}$	5,33	7,40
0,3 IBA	58,33	$6,69 \pm 0,52^{bcd}$	5,64	7,75
1 IBA	45,00	$5,30 \pm 0,38^{ab}$	4,10	6,49

Rezultati predstavljaju srednju vrednost iz nezavisnih eksperimenata $n = 60 \pm SE$. Statistički značajnu razliku ne pokazuju vrednosti označene istim slovom ($p \leq 0,05$).

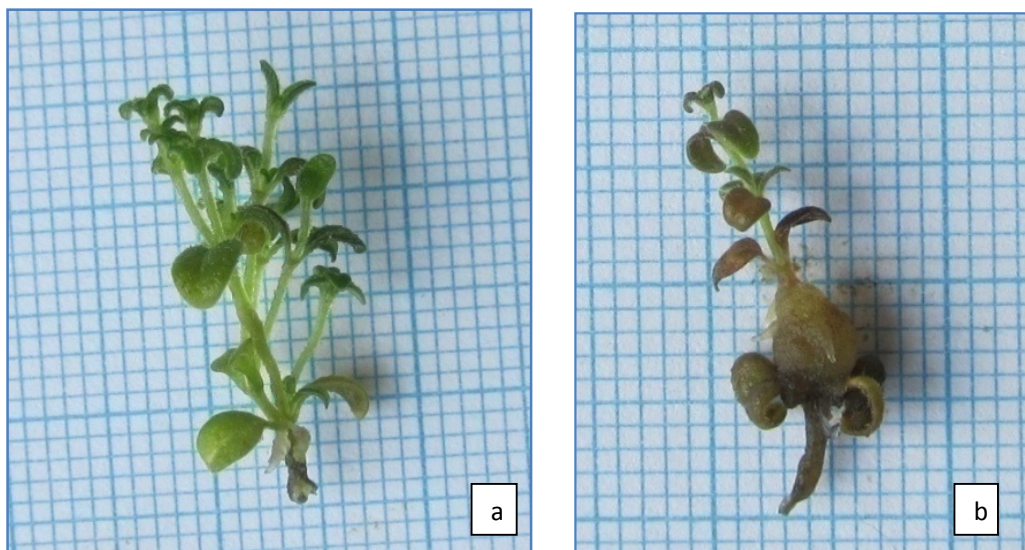
Prosečno najduže korenove 10,57 mm imali su izdanci ožiljeni na MS/2 podlozi sa 0,3 mg/l IAA (Slika 19 b). Na istoj podlozi ožiljen je i izdanak sa najdužim korenom 11,47 mm. Ovi izdanci su imali brojne, duže, zadebljale smeđe braon korenove. Pojedini korenovi su se talasasto pružali.

Prosečno najkraći korenovi 4,91 mm formirani su na izdancima gajenim na MS/2 podlozi sa 0,1 mg/l NAA (Slika 20 a), gde je takođe izmeren i najkraći koren 3,78 mm (Tab. 9). Izdanci sa ove podloge imali su izrazito kratke, malobrojne bele korenove formirane u nivou prvog nodusa.

Pojedini izdanci koji su gajeni na podlogama MS/2 sa 0,2 mg/l NAA su kalusirali. Sa porastom koncentracije NAA u podlozi povećana je učestalost pojave kao i veličina kalusa. To je praćeno promenom boje listova i redukovanim razvojem i rastom izdanaka, naročito na podlozi MS/2 sa 1 mg/l NAA (Slika 20 b). Na kratkim, slabo granatim izdancima formirano je smeđe kalusno tkivo iznad prvog para nekrotičnih listova koji su u dodiru sa podlogom. Kratki korenovi polaze sa kalusa ili iznad kalusa.



Slika 19. Ožiljeni izdanak *M. croatica* na podlozi MS/2 a) bez regulatora rastenja b) sa 0,3 mg/l IAA



Slika 20. Ožiljeni izdanak *M. croatica* na podlozi MS/2 sa a) 0,1 mg/l NAA, b) 1 mg/l NAA

4.2.4. Aklimatizacija biljaka *M. croatica*

Za aklimatizaciju su korišćeni ožiljeni izdanci, odnosno biljčice *Micromeria croatica* 5 nedelja nakon gajenja u kulturi (Slika 21 i 22). Bez obzira na kojoj su se podlozi ožilili, izdanci koji su imali formiran kalus nisu uzeti za aklimatizaciju. Biljčice *Micromeria croatica* posađene su u plastične čašice sa sterilisanom zemljom. Uspeh aklimatizacije u velikoj meri zavisio je od funkcionalnosti korenova koji su se formirali u fazi ožiljavanja. Tokom aklimatizacije formirali su se novi korenovi i listovi. Nakon što su formirale nove listove biljke su bile spremne za dalji rast u staklari a potom i u spoljašnjoj sredini.

Tokom perioda od 4 nedelje rasta u *ex vitro* uslovima aklimatizovano je 65% *in vitro* gajenih biljaka.



Slika 21. Biljke *M. croatica* dobijene *in vitro* na početku aklimatizacije

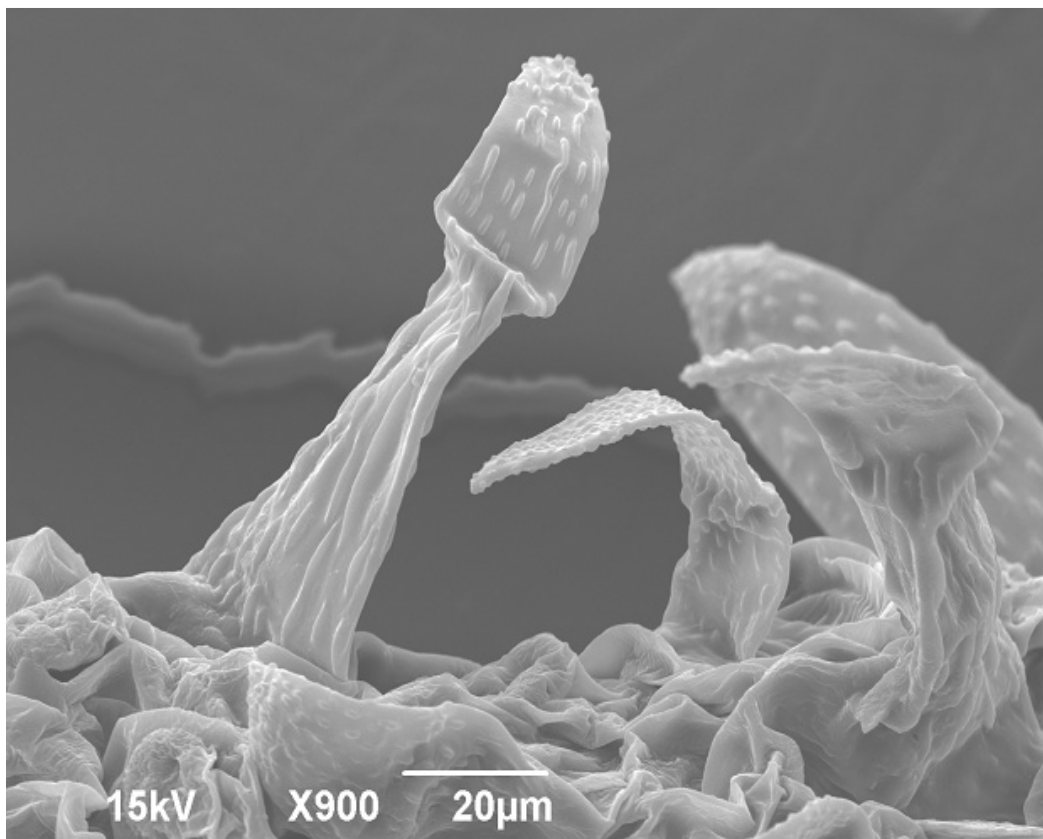


Slika 22. Biljke *M. croatica* dobijene *in vitro* u završnoj fazi aklimatizacije

4.3. MIKROMORFOLOŠKA I HISTOCITOLOŠKA ANALIZA TRIHOMA LISTOVA *M. pulegium*

Na elektronskim mikrografijama listova *M. pulegium* gajenih *in vitro* na MS podlozi bez fitohormona, mogu se zapaziti neglandularne (nežlezdane) i glandularne (žlezdane) trihome. Glandularne i neglandularne trihome prisutne su sa obe strane lista.

Neglandularne trihome građene su od jedne do tri ćelije raspoređene u nizu i negranate su. U osnovi su proširene, a potom se sužavaju idući ka vrhu i blago su nagnute na dole ka epidermisu. Pokrivene su debelom kutikulom sa ravnomerno raspoređenim bradavičastim zadebljanjima (Slika 23).

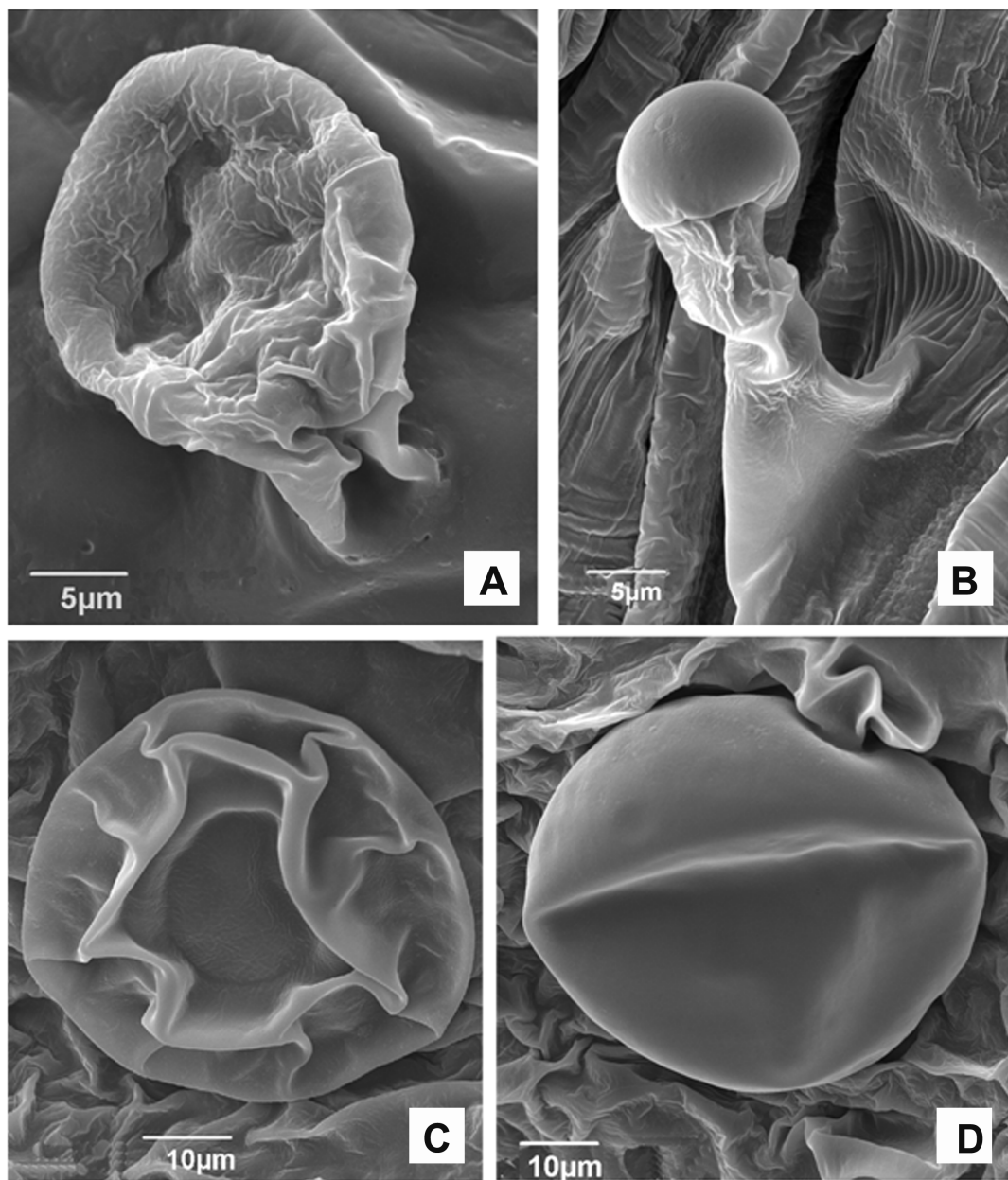


Slika 23. SEM Mikrografija *M. pulegium*, nežlezdani trihomi na adaksijalnoj strani.

Na listovima *M. pulegium* uočena su dva tipa glandularnih trihoma: peltatne i kapitatne. Peltatne trihome su građene od jedne ćelije baze, jedne kratke ćelije drške i sekretorne glave koju čini osam ćelija iznad kojih je kod zrelih trihoma razvijen veliki subkutikularni prostor. Peltatne trihome u presekretornoj fazi razvića imaju ulegnutu kutikulu, čvrsto pripijenu uz ćelijske zidove. U bazalnoj ćeliji peltatne trihome u presekretornoj fazi prisutni su ravnomerno raspoređeni brojni plastidi (Slika 28). Početak sekrecije karakteriše naborana kutikula koja se postepeno odvaja od ćelijskih zidova (Slika 24 C) što vodi povećanju volumena subkutikularnog prostora (Slika 24 D). Subkutikularni prostor peltatnih trihoma ispunjen sekretornim produktima poprima zaobljen izgled pokriven glatkom kutikulom (Slika 27 A). Po rupturi kutikule, produkti se oslobađaju van.

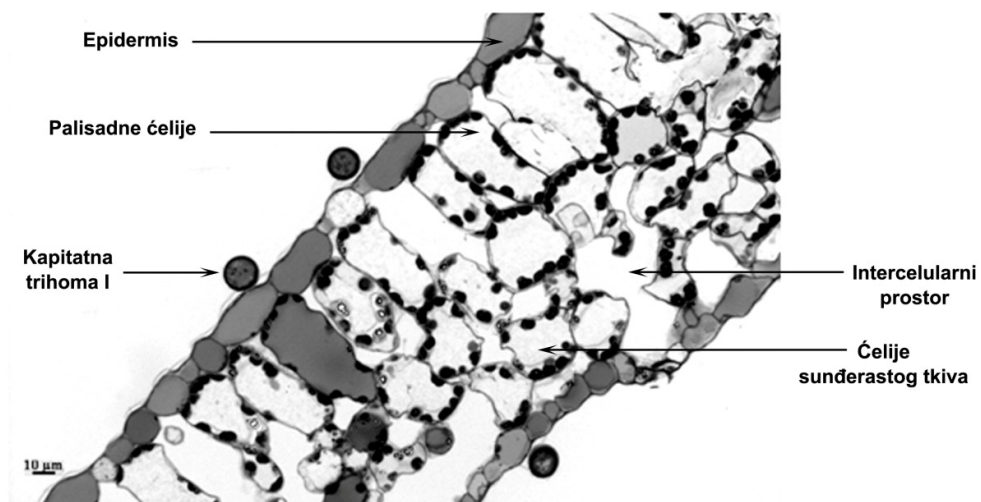
Na poprečnom preseku kroz list jasno se uočavaju kapitatne trihome na adaksijalnoj i abaksijalnoj epidermalnoj površini (Slika 25). Razlikuju se dva tipa

kapitatnih trihoma. Kapitatna trihoma tip I sastoji se od jedne bazalne ćelije, jedne ćelije drške i jednoćelijske sekretorne glave u prokumbentnom položaju, tako da je ćelija drške krivolinijskog pružanja. Ćelija glave je elipsoidnog ili krušolikog oblika i nema razvijen subkutikularni prostor (Slika 24 A, 26 A). Kapitatna trihoma tip II sastoji se od jedne bazalne ćelije, kupastog oblika, koja može biti jako izdužena, izdužene uspravne ćelije drške i jedne zaobljene ćelije glave. U fazi sekrecije ima dobro razvijen subkutikularni prostor (Slika 24 B, 26 B). U postsekretornoj fazi, dolazi do pucanja kutikule i oslobađanja sekretornih produkata (Slika 27 B).

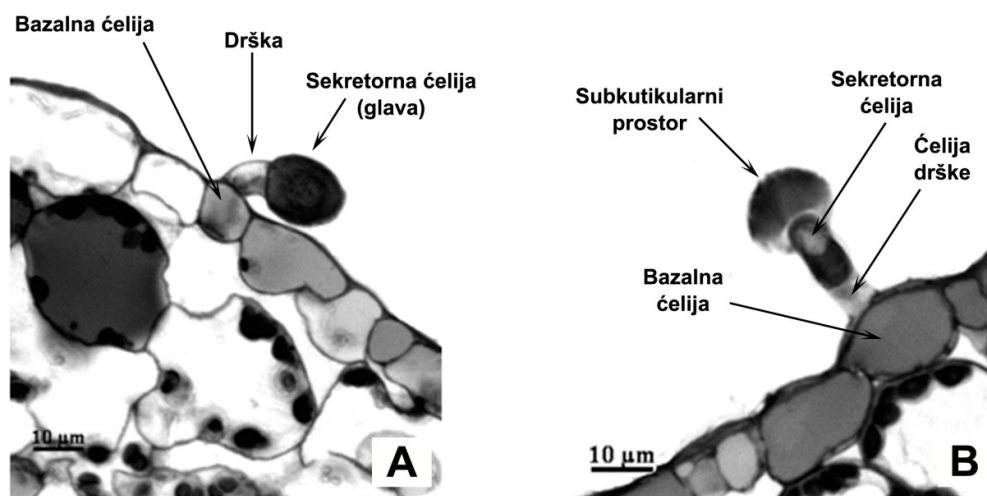


Slika 24. SEM Mikrografije *M. pulegium*

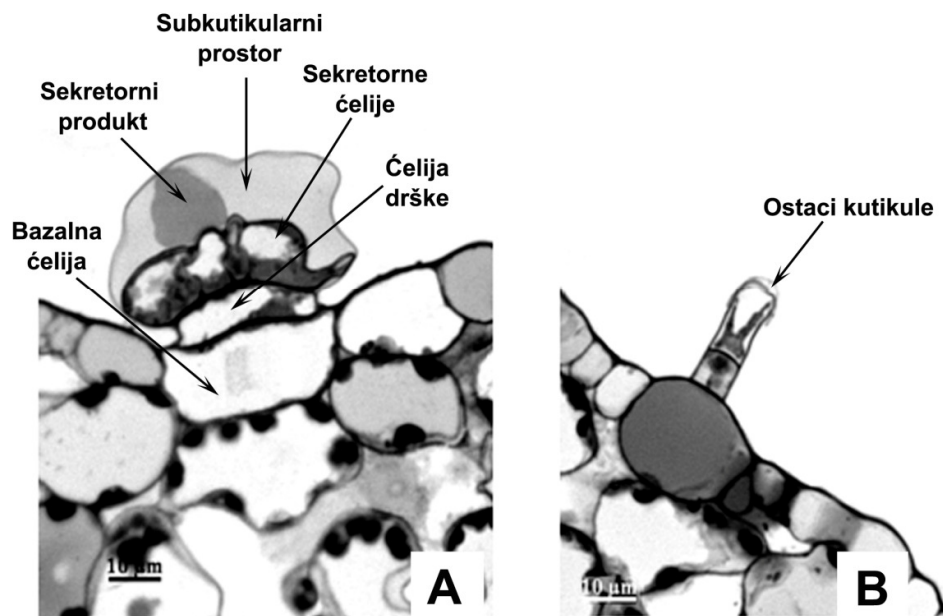
- A. Kapitatna trihoma tip I
- B. Kapitatna trihoma tip II u fazi sekrecije
- C. Peltatna trihoma u presekretornoj fazi
- D. Peltatna trihoma u ranoj sekretornoj fazi



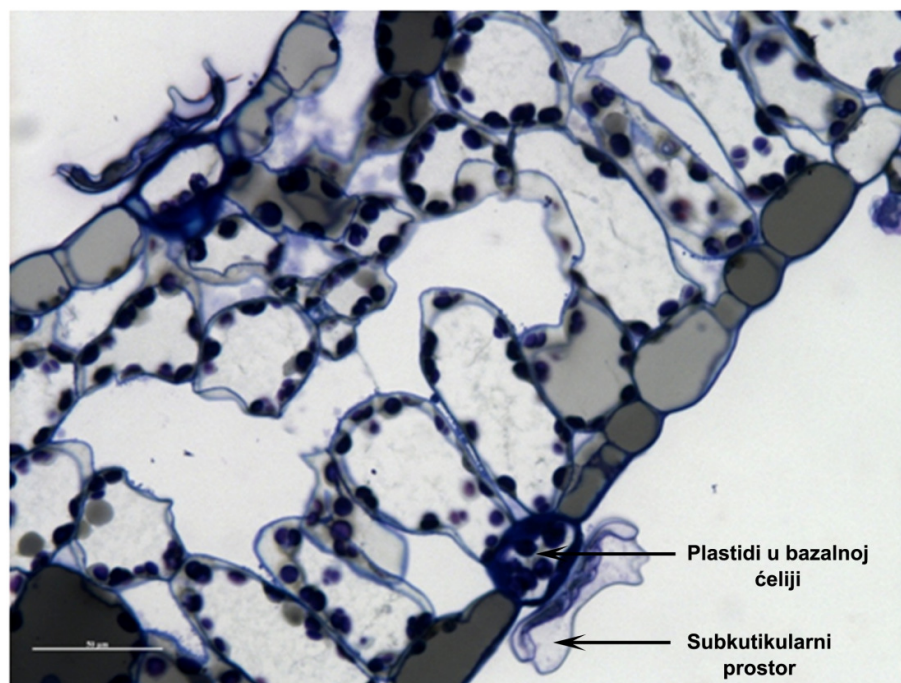
Slika 25. Poprečni presek kroz list *M. pulegium*



Slika 26. A: Građa kapitatne trihome tip I, B: Kapitatna trihoma tip II u fazi sekrecije



Slika 27. A. Peltatna trihoma u fazi pune sekrecije B. Kapitatna trihoma tip II u postsekretornoj fazi

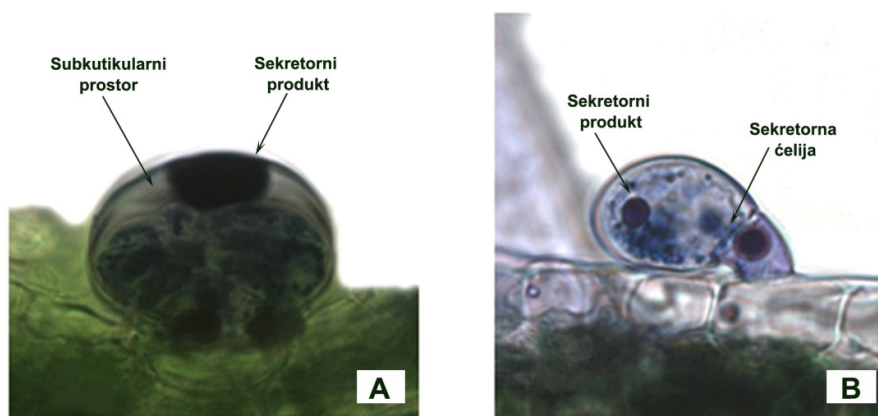


Slika 28. Peltatne trihome u presekretornoj fazi.

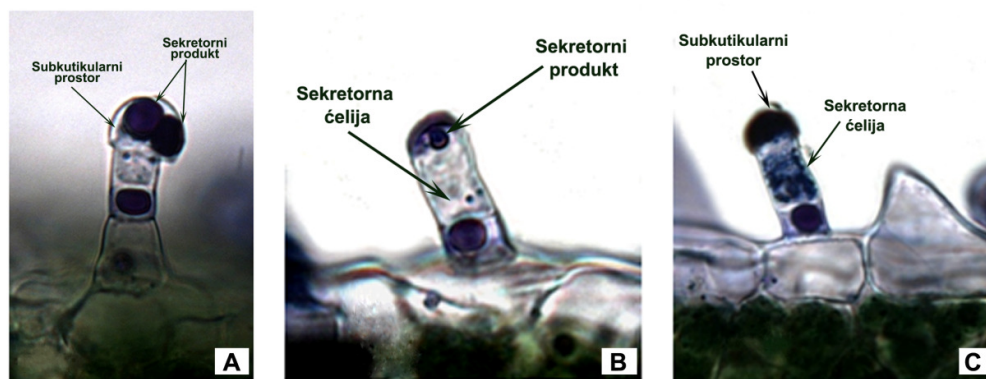
Listovi formirani na pupoljcima *M. pulegium* koji su rasli i razvijali se u kulturi *in vitro* na podlozi MS bez fitohormona podvrgnuti su fitohemijskoj analizi kako bi se dokazalo prisustvo sekretornih produkata u žlezdanim trihomima. Kako su vrste roda *Micromeria* bogate uljima, u kojima dominiraju terpeni, ispitano je prisustvo terpena u trihomama.

Njihovo prisustvo dokazuje se histohemijskom reakcijom sa NADI reagensom. Pojava ljubičaste boje dokazuje pozitivnu reakciju sekretornog materijala na terpene. Jaka pozitivna reakcija na ulja dokazana je intenzivno tamno plavo obojenim sekretornim kapima u trihomama. Na svežim presecima listova pozitivna reakcija na terpene zabeležena je kod sva tri tipa žlezdanih trihoma (Slika 31).

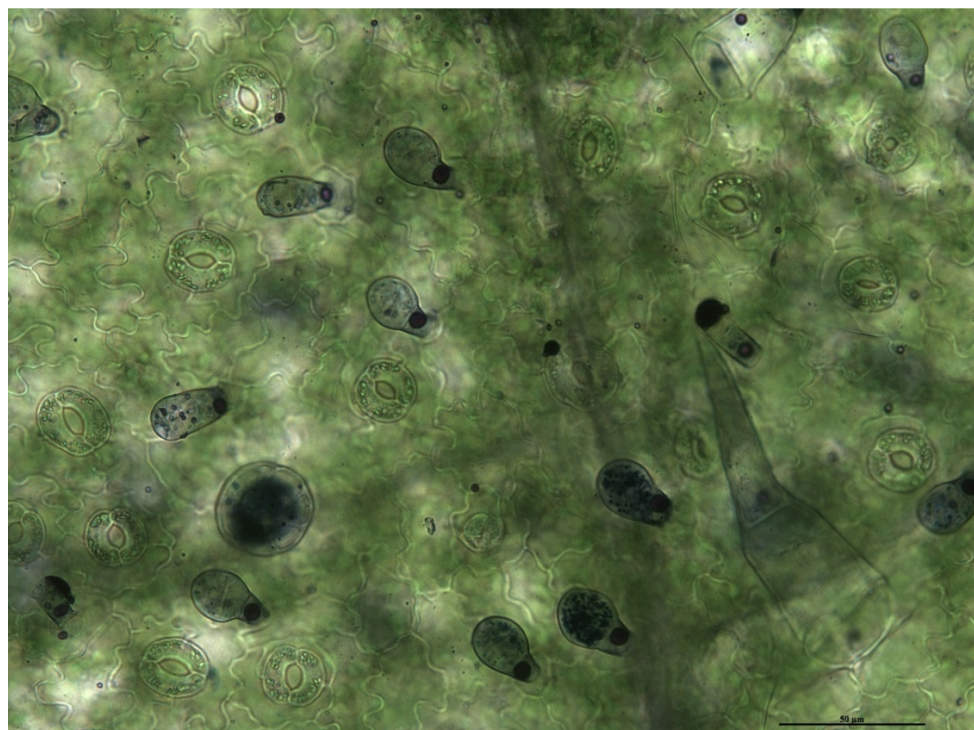
Sekretorni sadržaj intenzivno plavo - ljubičasto obojen, skoncentrisan je u centralnom delu subkutikularnog prostora peltatnih trihoma u vidu krupne kapi (Slika 29 A). Kapitatne trihome takođe pokazuju pozitivnu reakciju na terpene. U kapitanoj trihomi tip I sekretorni produkti su u vidu velike kapi pri vrhu sekretorne ćelije glave, a nalaze se takođe i u ćeliji drške (Slika 29 B). U kapitanoj trihomi tip II sekretorni produkti u vidu krupnih kapi ispinjavaju potpuno subkutikularan prostor, ali se mogu naći i u sekretornoj ćeliji i ćeliji drške (Slika 30. A, B, C). U ćeliji drške kao i u subkutikularnom prostoru sekretorni produkti su grupisani u veliku kap. Njihova distribucija u sekretornoj ćeliji je u obliku sitnijih kapi čiji je broj varijabilan. Sekretorne ćelije pojedinih kapitatnih trihoma tipa II imaju malo sitnih sekretornih kapi na periferiji ili ka vrhu (Slika 30. A, B), dok su kod nekih ispunjene brojnim gusto raspoređenim kapima (Slika 30. C).



Slika 29. A. Peltatna trihoma, B. kapitatna trihoma tip I



Slika 30. A. Kapitatna trihoma tip II u fazi sekrecije, B. Kapitatna trihoma tip II u fazi rane sekrecije, C. Kapitatna trihoma tip II u sekretornoj fazi



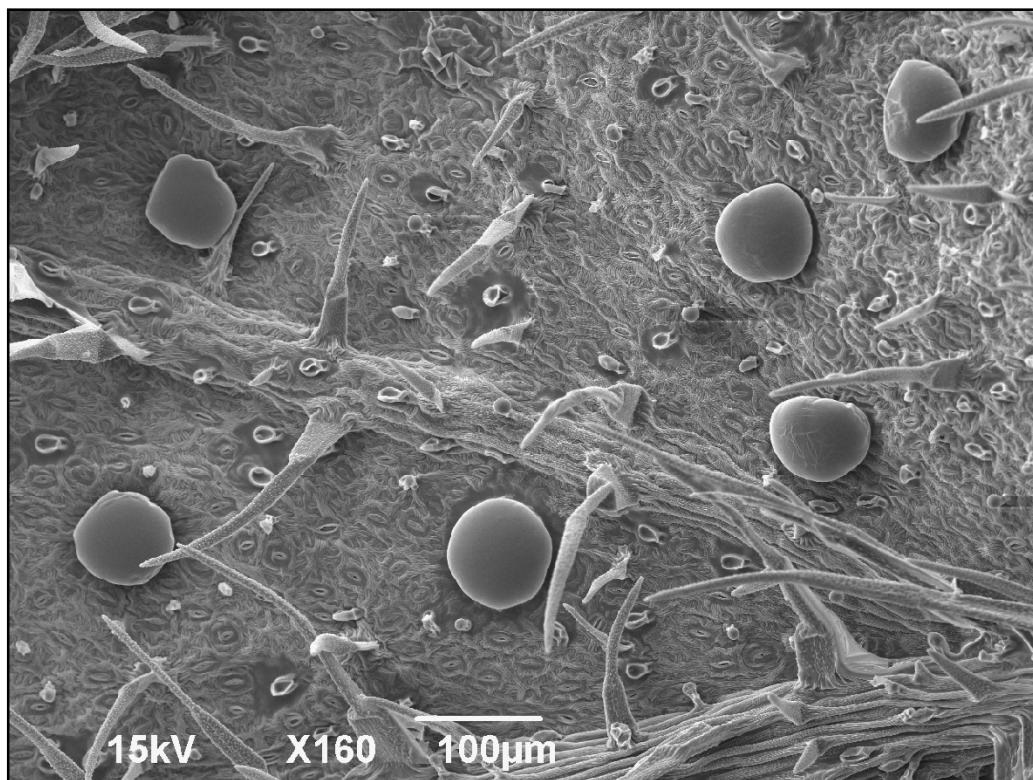
Slika 31. Pozitivna reakcija glandularnih trihoma na NADI.

4.4. MIKROMORFOLOŠKA I HISTOCITOLOŠKA ANALIZA TRIHOMA LISTOVA *M. croatica*

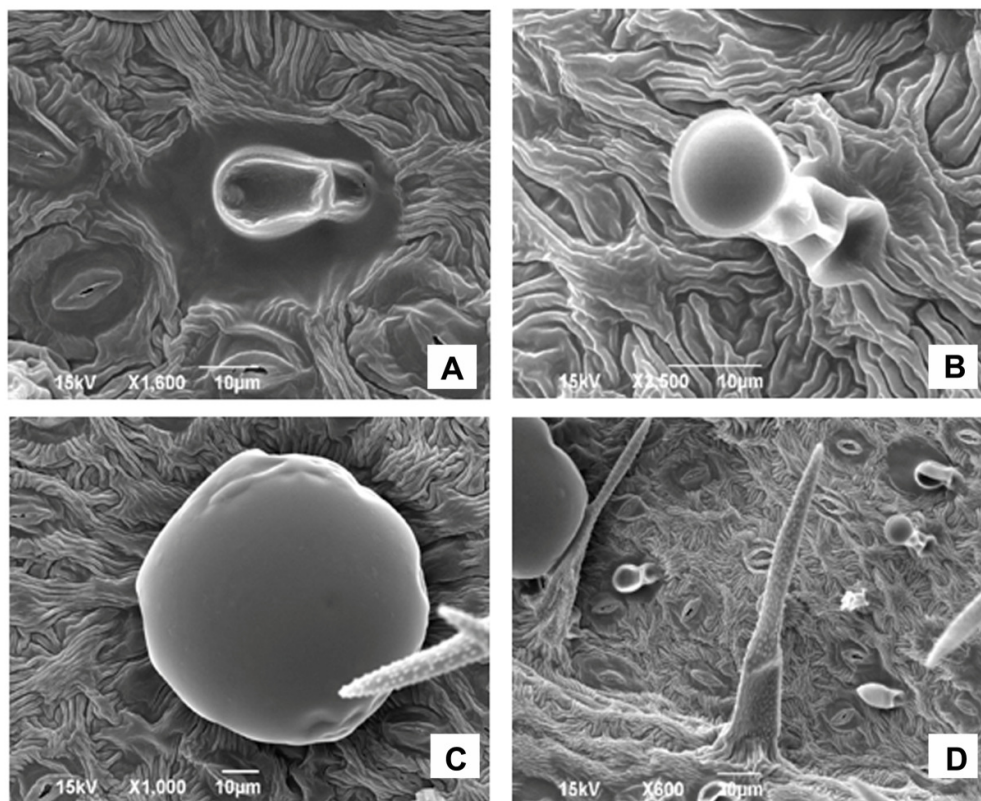
Na površini listova *M. croatica*, gajene *in vitro*, prisutne su brojne neglandularne i glandularne trihome (Slika 32 i 34). Neglandularne trihome su kratke konusne ili izdužene sa zašiljenim vrhom, uniserijatne i negranate (Slike 32, i 34 A). Sastoje se od jedne do tri ćelija. Na površini imaju brojne bradavičaste papile na kutikuli (Slika 33 D). Nežlezdane trihome su gušće raspoređene na abaksijalnoj strani lista, gde su i izdužene višćelijske zastupljenije u odnosu na kratke jednoćelijske (Slike 32, 33 D i 34 A).

Među glandularnim trihomama razlikuju se peltatne i kapitatne. Peltatne trihome su prisutne samo na abaksijalnoj strani lica (Slika 32 i 34 B). Građene su od jedne ćelije baze, kratke ćelije drške i višćelijske glave iznad koje se kod zrelih trihoma nalazi veliki subkutikularni prostor (Slika 33 C).

Kapitatne trihome lista determinisane su kao tip I i tip II. Tip I su trihome koje imaju jednu ćeliju u osnovi, jednu ćeliju drške i jednu elipsoidnu ćeliju glave koja je nagnuta ka površini epidermisa (Slika 33 A i 34 C). Kapitatne trihome tip II sastoje se od jedne ćelije u osnovi, drške koju izgrađuje jedna izdužena ćelija i jedne sekretorne ćelije glave globularnog oblika. Iznad sekretorne ćelije nalazi se mali subkutikularni prostor (Slika 33 B i 34 D). Na abaksijalnoj strani prisutni su svi tipovi žlezdanih trihoma, a na adaksijalnoj samo kapitatne trihome tip I.

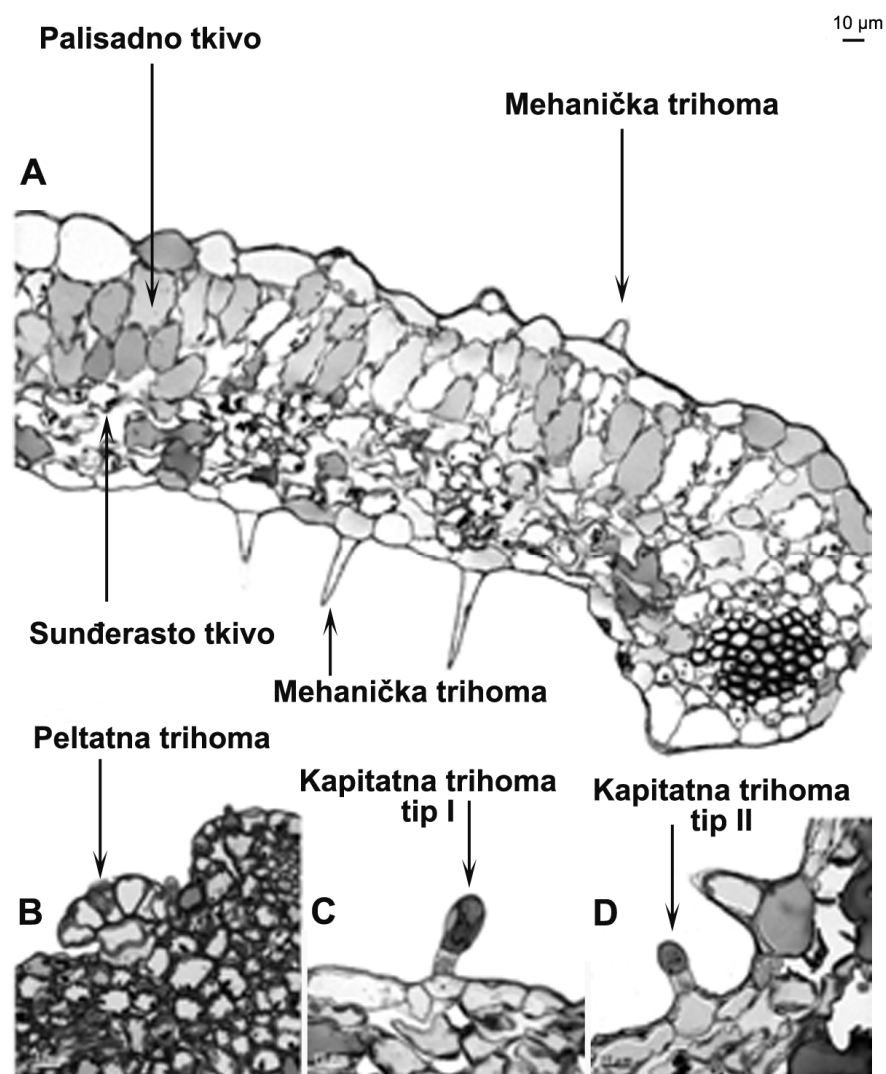


Slika. 32. Neglandularne i glandularne trihome na abaksijalnoj površini lista *M. croatica* gajene *in vitro*



Slika 33. SEM Mikrografije *M. croatica*

- A. Kapitratna trihoma Tip I na abaksijalnoj površini lista *M. croatica* gajene *in vitro*,
 B. Kapitratna trihoma Tip II na abaksijalnoj površini lista *M. croatica* gajene *in vitro*
 C. Peltatna trihoma na abaksijalnoj površini lista *M. croatica* gajene *in vitro*,
 D. Neglandularne i glandularne trihome na abaksijalnoj površini lista *M. croatica* gajene *in vitro*



Slika 34. . Poprečni presek kroz list *M. croatica*

A. Mehaničke trihome na abaksijalnoj i adaksijalnoj površini lista *M. croatica* gajene *in vitro*

B. Peltatna trihoma na abaksijalnoj površini lista *M. croatica* gajene *in vitro*

C. Kapitatna trihoma Tip I na abaksijalnoj površini lista *M. croatica* gajene *in vitro*

D. Kapitatna trihoma Tip II na abaksijalnoj površini lista *M. croatica* gajene *in vitro*

4. 5. HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA *Micromeria*

4.5.1. Količina i hemijski sastav etarskih ulja *M. pulegium*

Nadzemni delovi biljaka iz prirode *M. pulegium* imali su najveći sadržaj ulja, 0,47%. Sadržaj ulja kod izdanaka gajenih na podlozi MS bez fitohormona iznosio je 0,38%, odnosno na 0,24% kod izdanaka gajenih na podlozi MS sa 10 μ M BA (Tab. 10).

U etarskim uljima biljaka iz prirode *M. pulegium*, gajenih na MS podlozi i na MS podlozi sa 10 μ M BA identifikovana je 21 komponenta što čini 98,21% , 98,19% odnosno 96,14% od ukupnog sastava ulja (Tabela 10). Zajednička karakteristika svih ulja je visok sadržaj monoterpena od 85,53 - 96,48%. Među njima dominiraju oksidovani monoterpeni, dok je monoterpenskih ugljovodonika znatno manje. U uljima izdanaka gajenih u kulturi *in vitro*, sadržaj monoterpena je manji u odnosu na ulja biljaka iz prirode. Seskviterpensi ugljovodonici nisu zastupljeni u ulju biljaka iz prirode, za razliku od ulja izdanaka gajenih *in vitro*. Oksidovanih seskviterpena nema u ulju izdanaka gajenih *in vitro* bez fitohormona.

Tabela 10. Hemijski sastav etarskih ulja biljaka *M. pulegium* iz prirode i gajenih u kulturi *in vitro* na hranljivim podlogama MS i MS sa 10 μ M BA

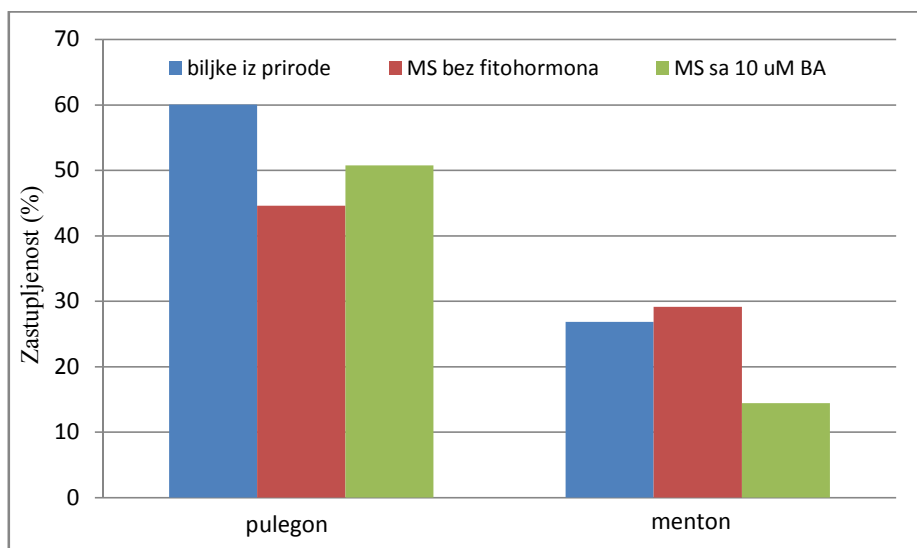
Redni broj	Komponente %	RI	Biljke iz klisure Svrliškog Timoka	Kultura tkiva <i>in vitro</i> (MS)	Kultura tkiva <i>in vitro</i> (MS+ 10 BA)
	Sadržaj %		0,47	0,38	0,24
1	α -Pinen	936	0,34	0,61	0,87
2	Sabinen	976	-	0,31	0,74
3	β -Pinen	980	0,76	1,89	7,07
4	Mircen	993	-	0,41	0,61
5	3-Oktanol	997	0,26	-	-
6	Limonen	1030	1,20	1,35	2,77
7	Menton	1157	26,85	29,14	14,45
8	Izomenton	1167	1,04	2,30	1,25

9	Isopulegon	1179	1,20	1,27	0,87
10	Pulegon	1243	60,07	44,57	50,77
11	Piperiton	1256	1,45	-	-
12	Piperiton epoksid	1258	-	4,91	2,29
13	Geranial	1273	-	0,71	-
14	Piperitenon	1345	3,57	2,16	1,38
15	Piperitenon oksid	1369	-	2,94	2,46
16	β -Kariofilen	1423	-	0,93	1,28
17	Germacren D	1485	-	3,62	6,06
18	Biciklogermacren	1500	-	1,07	2,13
19	<i>cis</i> - Kalamenen	1525	-	-	0,59
20	Spatulenol	1582	0,62	-	0,55
21	Kariofilen oksid	1588	0,85	-	-
	Monoterpeni		96,48	92,57	85,53
	Monterpenski ugljovodonici		2,30	4,57	12,06
	Oksidovani monoterpeni		94,18	88,00	73,47
	Seskviterpeni		1,47	5,62	10,61
	Seskviterpenski ugljovodonici		-	5,62	10,05
	Oksidovani seskviterpeni		1,47	-	0,55
	Druge komponente		0,26	-	-
	Ukupno		98,21	98,19	96,14

RI- Kovačev (retencioni) indeks eksperimentalno određen (AMDIS)

U svim analiziranim uljima, bez obzira na poreklo materijala, dominiraju iste komponente: **pulegon** i **menton**. Pulegon je u uzorcima ulja najviše zastupljen u materijalu iz prirode (poredak: priroda > MS sa 10 μ M BA > MS), a menton u ulju poreklom od izdanaka gajenih na MS podlozi bez fitohormona (poredak: MS > priroda > MS sa 10 μ M BA). Prisustvo BA u hranljivoj podlozi smanjuje sadržaj pulegona u ulju za 15% u odnosu na ulja biljaka iz prirode, ali povećava za 14% u odnosu na ulja

izdanaka koji su gajeni u kulturi *in vitro* bez fitohormona. Sadržaj mentona u ulju izdanaka gajenih na podlozi sa 10 μ M BA je za 46%, niži u odnosu na ulja biljaka iz prirode, a za 50% u odnosu na ulja izdanaka gajenih *in vitro* bez fitohormona (his. 1).



Histogram 1. Dominantne komponente u etarskim uljima *M. pulegium*

Od identifikovanih jedinjenja u uljima izdanaka gajenih *in vitro*, nisu zastupljeni 3-oktanol, piperiton i kariofilen oksid. Pojedine komponente kojih ima u ulju biljaka gajenih *in vitro* nisu zastupljene u ulju biljaka iz prirode (sabinen, mircen, piperiton oksid, geranial, piperitenon oksid, β -kariofilen, germakren D, biciklogermakren i *cis*-kalamenen). Kvalitativne razlike etarskih ulja *biljaka M. pulegium* koje su gajene na različite načine, odnose se na komponente koje su zastupljene u količinama jednakim ili manjim od 0,7%. Kvalitativne razlike u sastavu ulja postoje i među uljima poreklom od izdanaka gajenih u uslovima *in vitro* na podlozi bez i sa fitohormonom. Od identifikovanih jedinjenja u uljima izdanaka gajenih *in vitro* na MS podlozi bez fitohormona nema *cis*-Kalamenena i Spatulenola, dok se oni nalaze u ulju izdanaka gajenih na podlozi MS sa 10 μ M BA. Ulja izdanaka gajenih na podlozi MS sa 10 μ M BA ne sadrže Geranial, koji je prisutan u ulju izdanaka gajenih *in vitro* na MS podlozi bez fitohormona.

4.5.2. Količina i hemijski sastav etarskih ulja *M. croatica*

Sadržaj etarskih ulja izdanaka biljaka iz prirode *M. croatica* iznosio je 0,21%. Izdanci koji su gajeni u kulturi *in vitro* na MS podlozi bez fitohormona, imali su manju količinu ulja 0,14%. Gajenjem u kulturi *in vitro* na MS podlozi sa 0,3 μ M kinetina, sadržaj ulja bio je duplo veći u odnosu na biljke iz prirode i iznosio je 0,45%.

U etarskim uljima *M. croatica* iz prirode i gajenih u kulturi *in vitro* na podlogama MS bez fitohormona i MS sa 0,3 μ M kinetina identifikovane su 44 komponente koje čine 90,98%, 82,24% odnosno 92,99%, od ukupnog sastava svakog uzorka ulja. U ulja biljaka koje su poreklom iz prirode, skoro podjednako su zastupljeni monoterpeni (46,61%) i seskviterpeni (44,37). U uljima izdanaka gajenih u kulturi *in vitro* na podlogama MS bez fitohormona i MS sa 0,3 μ M kinetina dominiraju monoterpenske komponente i njihov sadržaj je 57,97% odnosno 74,72%. U sva tri ulja oksidovani monoterpeni su znatno više zastupljeni nego monoterpenski ugljovodonic. U uljima izdanaka gajenih *in vitro* sadržaj monoterpena bio je veći u odnosu na ulja biljaka iz prirode, a sadržaj seskviterpena manji (Tab. 11).

Tabela 11. Hemijski sastav etarskih ulja biljaka *Micromeria croatica* poreklom iz prirode i gajenih u kulturi *in vitro* na hranljivim podlogama MS i MS sa 0,3 μ M kinetina

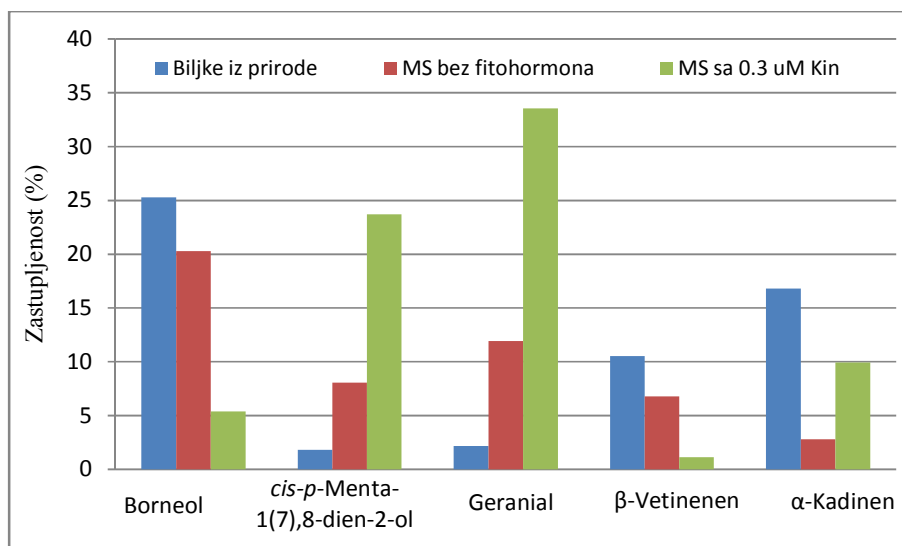
Redni broj	Komponente %	RI	Biljke sa Mokre Gore	Kultura tkiva <i>in vitro</i> (MS)	Kultura tkiva <i>in vitro</i> (MS+0,3 Kin)
	Sadržaj %		0,21	0,14	0,45
1	α -Tujen	925	-	-	0,16
2	α -Pinen	932	1,32	1,18	2,35
3	Kamfen	947	1,17	1,02	0,97
4	Sabinen	975	-	-	0,27
5	β -Pinen	976	2,05	1,60	1,97
6	6-Metil-5-hepten-2-on	984	-	0,39	0,77
7	Mircen	988	-	-	0,3
8	δ -3-Karen	1010	0,50	0,97	2,04
9	<i>p</i> -Cimen	1021	-	0,25	0,08

10	<i>o</i> -Cimen	1023	-	0,34	0,10
11	Limonen	1027	0,35	0,59	0,83
12	γ -Terpinen	1066	1,29	0,80	0,51
13	Tepinolen	1098	1,02	0,90	0,30
14	α -Kamfoleal	1125	0,4	0,60	0,08
15	Kamfor	1144	3,97	2,99	0,38
16	Pinokarvon	1162	0,92	0,90	0,62
17	Borneol	1170	25,28	20,30	5,40
18	Terpinen-4-ol	1177	0,75	1,51	0,18
19	<i>m</i> -Cimen-8-ol	1181	0,27	-	-
20	<i>p</i> -Cimen-8-ol	1185	0,21	0,38	-
21	α -Terpineol	1193	0,24	0,31	0,11
22	Mirtenal	1196	1,40	1,25	0,13
23	Verbenon	1209	0,72	0,67	-
24	Izobornil format	1227	0,20	0,89	0,72
25	<i>cis-p</i>-Menta-1(7),8-dien-2-ol	1244	1,83	8,06	23,69
26	Karvon	1244	0,24	-	-
27	Geranial	1270	2,19	11,93	33,53
28	Izobornil acetat	1285	0,29	0,53	-
29	β -Kariofilen	1419	2,20	2,04	1,47
30	α -Humulen	1453	0,34	-	0,25
31	allo-Aromadendren	1461	-	0,56	-
32	γ -Murolen	1475	0,67	0,37	0,37
33	Biciklogermakren	1496	0,61	0,62	0,52
34	α -Murolen	1499	0,33	0,37	-
35	γ -Kadinen	1513	0,99	0,93	0,16
36	δ -Kadinen	1523	1,67	2,26	0,54
37	α-Kadinen	1581	16,80	2,80	9,95
38	β- Vetivenen	1587	10,54	6,80	1,5
39	Humulen epoksid II	1609	1,14	0,69	0,12

40	Epi- α -Kadinol	1642	3,60	2,07	0,73
41	α -Murolol	1646	0,96	-	0,28
42	Kubenol	1656	4,52	3,28	1,44
43	Abietatrien	2052	-	0,46	-
44	<i>trans</i> - Feruginol	2295	-	0,63	0,52
	Monoterpeni		46,61	57,97	74,72
	Monoterpenski ugljovodonici		7,7	7,65	9,88
	Oksidovani monoterpeni		38,91	50,32	64,84
	Seskviterpeni		44,37	22,79	16,98
	Seskviterpenski ugljovodonici		34,15	16,75	14,41
	Oksidovani seskvitepeni		10,22	6,04	2,57
	Diterpeni		-	1,09	0,52
	Druge komponente		-	0,39	0,77
	Ukupno		90,98	82,24	92,99

RI- Kovačev (retencioni) indeks eksperimentalno određen (AMDIS)

U ulju biljaka iz prirode, dominantne komponente su borneol 25,28 %, α -kadinen 16,80% i β -vetivenen 10,54 %. U ulju izdanaka gajenih *in vitro* na MS podlozi bez fitohormona dominantne komponente su borneol 20,30%, geranial 11,93%, *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol 8,06% i β -vetivenen 6,80%. Dominantne komponente u ulju izdanaka gajenih *in vitro* na podlozi MS sa 0,3 μ M kinetina su geranial 33,53%, *cis-p*-menta-1(7), 8-dien-2-ol 23,69% i α -kadinen 9,95%, dok je borneol zastupljen u količini od 5,40% a β -vetivenen u količini od svega 1,5%. Izdanci koji su rasli na hranljivoj podlozi sa kinetinom imali su manji sadržaj borneola u ulju za 79 % u odnosu na ulje samoniklih biljaka i za 73% u odnosu na ulja izdanaka koji su rasli bez fitohormona. Ulje izdanaka gajenih na podlozi sa kinetinom sadrži najviše geranial, oko 15 puta više od ulja biljaka iz prirode i približno 3 puta više od ulja izdanaka gajenih *in vitro* u odsustvu fitohormona u hranljivoj podlozi. Takođe, sadrži oko 12 puta veću količinu *cis-p*-menta-1(7), 8-dien-2-ol-a od ulja biljaka iz prirode i skoro 3 puta više od ulja izdanaka gajenih *in vitro* u odsustvu fitohormona. (Fig. 2).



Histogram 2. Dominantne komponente u etarskim uljima *M. croatica*

Hemijski sastav etarskih ulja izolovanih iz vegetativnih izdanaka *M. croatica* koje su rasle i razvijale se na prirodnom staništu i na različitim podlogama u uslovima *in vitro* razlikuje se kvantitativno i kvalitativno. Od identifikovanih jedinjenja u uljima izdanaka gajenih *in vitro*, nisu zastupljeni *m*-Cimen-8-ol i Karvon. Pojedine komponente kojih ima u ulju biljaka gajenih *in vitro* nisu zastupljene u ulju biljaka iz prirode (α -Tujen, Sabinen, 6-Metil-5-hepten-2-on, Mircen, *p*-Cimen, *o*-Cimen, allo-Aromadendren, Abietatrien i *trans*-Feruginol). Kvalitativne razlike se odnose na jedinjenja koja se zastupljena u količinama jednakim, ili ispod 0,77%. Od identifikovanih jedinjenja u uljima izdanaka gajenih *in vitro* na MS podlozi bez fitohormona nema sledećih jedinjenja: α -Tujen, Sabinen, Mircen, α -Humulen i α -Murolol, koja se nalaze u ulju izdanaka gajenih na podlozi MS sa 0,3 μ M kinetina. Ulja izdanaka gajenih na podlozi MS sa 0,3 μ M kinetina ne sadrže *p*-Cimen-8-ol, Verbenon, allo-Aromadendren, α -Murolen i Abietatrien.

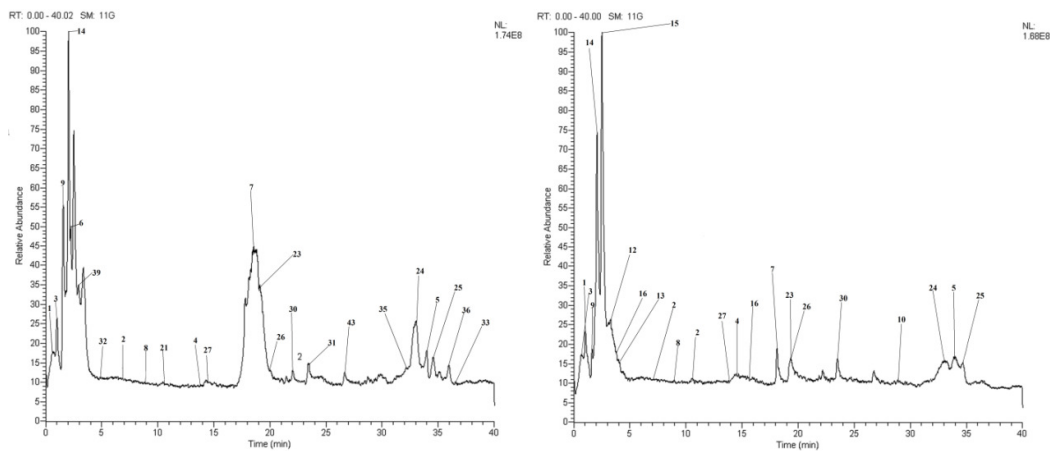
4.6. HEMIJSKA ANALIZA EKSTRAKATA *M. pulegium* i *M. croatica*

Biljni materijal *M. pulegium* i *M. croatica* sakupljen u prirodi i od izdanaka koji su gajeni u uslovima *in vitro* na MS podlozi bez regulatora, rastenja korišćen je za pripremu ekstrakata za analizu hemijskog sastava. Korišćena su tri rastvarača različite polarnosti: metanolni (polaran), etilacetatni (slabopolaran) i heksan (nepolaran). Ekstrakti su zatim analizirani tečnom hromatografijom visoke efikasnosti sa masenom detekcijom visoke rezolucije i rezultati su predstavljeni grafički u obliku hromatograma ukupne jonske struje za *M. pulegium* (grafik 1, 2, 3) i *M. croatica* (grafik 4, 5, 6). Za svaki od pikova sa svakog hromatograma snimljeni su maseni spektri visoke rezolucije, kako bi tačno moglo da se utvrdi da li potiču od istih jedinjenja. Ovako dobijeni maseni spektri su upotrebljeni za identifikaciju jedinjenja na osnovu poređenja karakterističnih pikova iz masenih spektra sa podacima iz literature. Jedinjenja koja su identifikovana na taj način prikazana su tabelarno (Tab. 12 i 13).

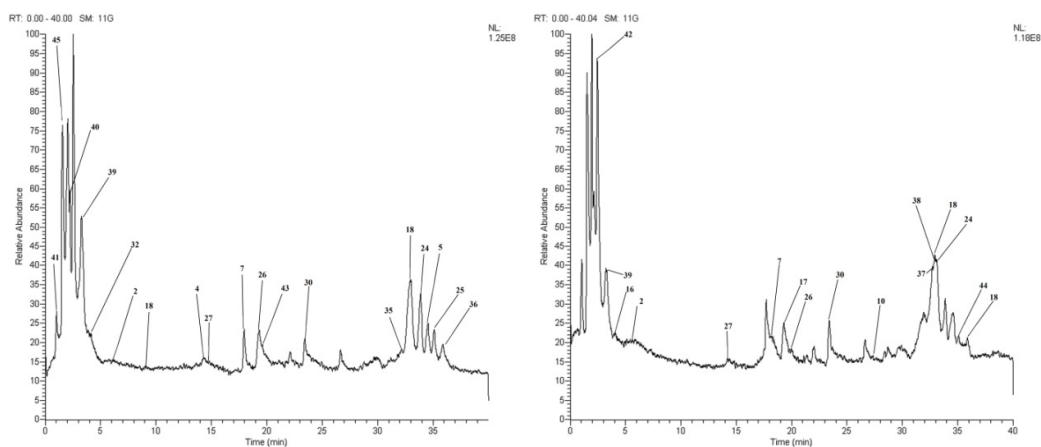
U ekstraktima dve vrste *Micromeria* identifikovano je ukupno 53 jedinjenja. U ekstraktima *M. pulegium* identifikovano je 45 jedinjenja, od kojih je 80% zastupljeno u ekstraktima od biljnog materijala poreklom iz prirode i 62,22% u ekstraktima dobijenim od izdanaka gajenih *in vitro*. Jedinjenja koja su zajednička tj. identifikovana u biljkama iz prirode i u izdancima gajenim u uslovima *in vitro* čine 42,22%. Jedinjenja koja su prisutna samo u uzorcima iz prirode i nema ih u *in vitro* gajenim izdancima čine 37,78%. Manji udeo, 20% čine jedinjenja koja su prisutna isključivo u izdancima propagiranim u uslovima *in vitro*, i kojih nema u uzorcima iz prirode.

Najviše identifikovanih jedinjenja je ekstrahovano metanolom. Upoređujući metanolne ekstrakte *M. pulegium* iz prirode i kulture *in vitro*, može se primetiti da je 51,72% jedinjenja prisutno u oba uzorka. Sa smanjenjem polarnosti rastvarača opada broj identifikovanih jedinjenja, kao i broj jedinjenja koja čine zajedničku frakciju za uzorke *M. pulegium* čije je razviće bilo u različitim uslovima (u prirodi i *in vitro*).

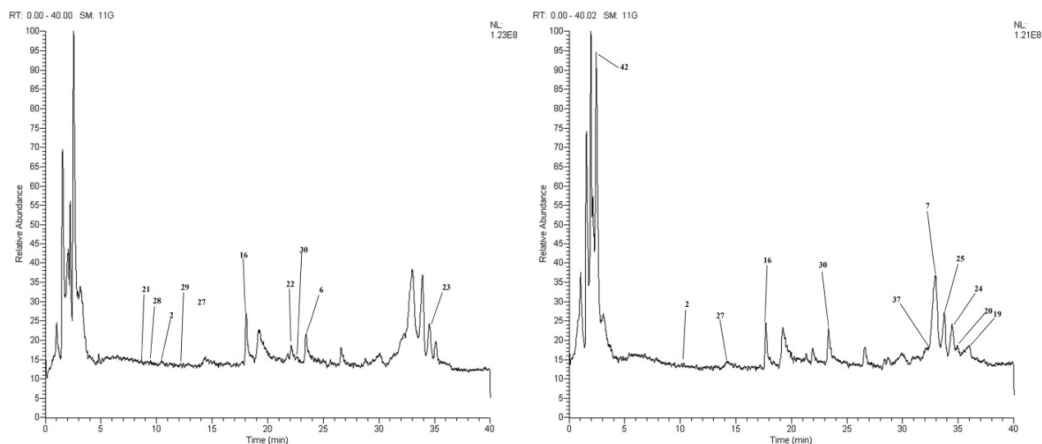
U etilacetatnim ekstraktima uzoraka iz prirode i kulture *in vitro* nalazi se 28,57% zajedničkih jedinjenja, a najmanje ih je u heksanskim ekstraktima 22,22% (Tab. 12).



Grafik 1. Totalni jonski hromatogrami metanolnih ekstrakata *M. pulegium* poreklom iz prirode (levo) i poreklom od izdanaka nakon 4 nedelje rasta u kulturi *in vitro*; brojevi jedinjenja odgovaraju brojevima iz tabele 12.



Grafik 2. Totalni jonski hromatogrami etilacetatnih ekstrakata *M. pulegium* poreklom iz prirode (levo) i poreklom od izdanaka nakon 4 nedelje rasta u kulturi *in vitro*; brojevi jedinjenja odgovaraju brojevima iz tabele 12.



Grafik 3. Totalni jonski hromatogrami heksanskih ekstrakata *M. pulegium* poreklom iz prirode (levo) i poreklom od izdanaka nakon 4 nedelje rasta u kulturi *in vitro*; brojevi jedinjenja odgovaraju brojevima iz tabele 12.

Tabela 12. Jedinjenja identifikovana u ekstraktima *M. pulegium* poreklom iz prirode i kulture *in vitro*, na osnovu poređenja MS spektara sa literaturnim podacima.

Broj jedinjenja	Jedinjenje	<i>M. pulegium</i> priroda	<i>M. pulegium</i> <i>in vitro</i>	Litera- tura
1.	Diosmetin	+ ^a	+ ^a	[345]
2.	Teukrin G	+ ^{a,b,c}	+ ^{a,b,c}	[345]
3.	Di-O-galoil- β -D-kopiranozid	+ ^a	+ ^a	[345]
4.	Eriocitrin	+ ^{a,b}	+ ^a	[135]
5.	Dihidrolanosterol	+ ^{a,b}	+ ^a	[135]
6.	Ruzmarinska kiselina	+ ^{a,c}	-	[345]
7.	Diosmetin-7-O-glikozid	+ ^{a,b}	+ ^{a,b,c}	[345]
8.	Alisol C	+ ^a	+ ^a	[62]
9.	Alisol B	+ ^a	+ ^a	[62]

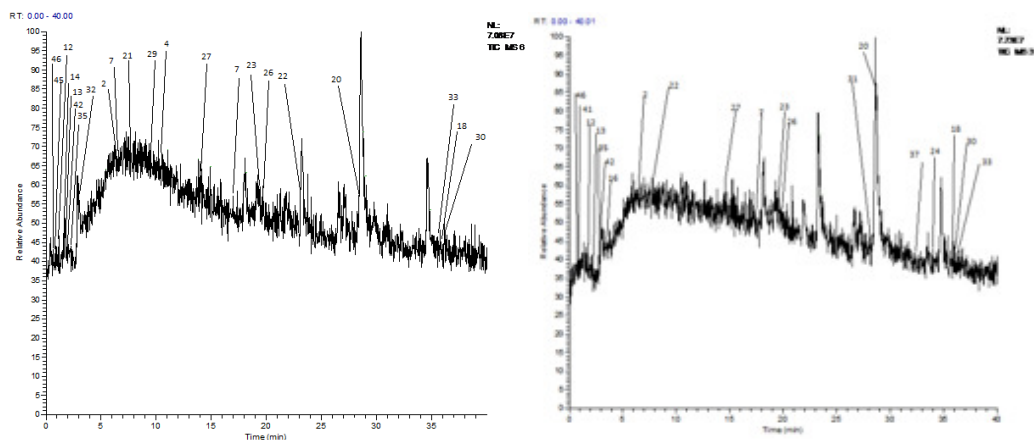
10.	Atraktienolid II	-	+ ^{a,b}	[62]
11.	Peoniflorin	+ ^b	-	[62]
12.	Trans-cimetna kiselina	-	+ ^a	[345]
13.	Vanilinska kiselina	-	+ ^a	[345]
14.	Dihidroksimetoksiflavon glikozid	+ ^a	+ ^a	[302]
15.	Feruličnakiselina	-	+ ^a	[62]
16.	Apigenin	+ ^c	+ ^{a,b,c}	[305]
17.	5β-Holestan-3α7α12α25-tetrol	-	+ ^b	[135]
18.	Riligustilid	-	+ ^b	[62]
19.	Alisol C 23-acetat	+ ^b	+ ^{b,c}	[62]
20.	Alisol F	-	+ ^c	[62]
21.	C ₂₁ H ₃₃ O ⁺	+ ^c	-	[62]
22.	Izomaltopeoniflorin	+ ^c	-	[62]
23.	Diosmetin-6-C-glukozid	+ ^{a,c}	+ ^a	[182]
24.	Teuflin	+ ^{a,b}	+ ^{a,b,c}	[345]
25.	Teucidin	+ ^{a,b}	+ ^{a,c}	[345]
26.	Kvercetin-3-O-ramnozid	+ ^{a,b}	+ ^{a,b,c}	[305]
27.	Galna kiselina mnohidrat	+ ^{a,b,c}	+ ^{a,bc}	[345]
28.	Salvinorin E	+ ^{a,b,c}	-	[206]
29.	Salvinorin C	+ ^c	-	[206]
30.	[C ₁₈ H ₁₂ O ₃ -Na] ⁺	+ ^{a,b,c}	+ ^{a,b,c}	[206]

31.	Kamferol-3-O-ramnozid	+ ^a	-	[53]
32.	Cikloartenol trans-ferulat	+ ^{a,b}	-	[53]
33.	C ₂₇ H ₄₁ O ₂	+ ^a	-	[179]
34.	C ₂₁ H ₃₁ ⁺	+ ^a	-	[179]
35.	5β-Holestan-3α7α12α25-tetrol	+ ^{a,b}	-	[135]
36.	5,2'-Dihidroksi-6,7,8,6'- tetrametoksiflavon	+ ^{a,b}	-	[183]
37.	Heksametoksiflavon	-	+ ^b	[345]
38.	Monohidroksi-heksametoksiflavon	-	+ ^{b,c}	[345]
39.	2Z-(Heptadek-12-enil)-4-hidroksi- 3,4,7,8-tetrahidro-2H-hromen-5(6H)- one	+ ^{a,b}	+ ^b	[335]
40.	Norisoboldin	+ ^b	-	[61]
41.	apigenin-7-O-glukuronid	+ ^b	-	[61]
42.	luteolin-7-O-rutinozid	+ ^c	+ ^b	[181]
43.	kamferol-3-O –glukozid (adukt sa Na)	+ ^b	-	[181]
44.	Epikatehingalat	+ ^b	-	[186]
45.	Dihidroksiholesterol	+ ^b	-	[135]

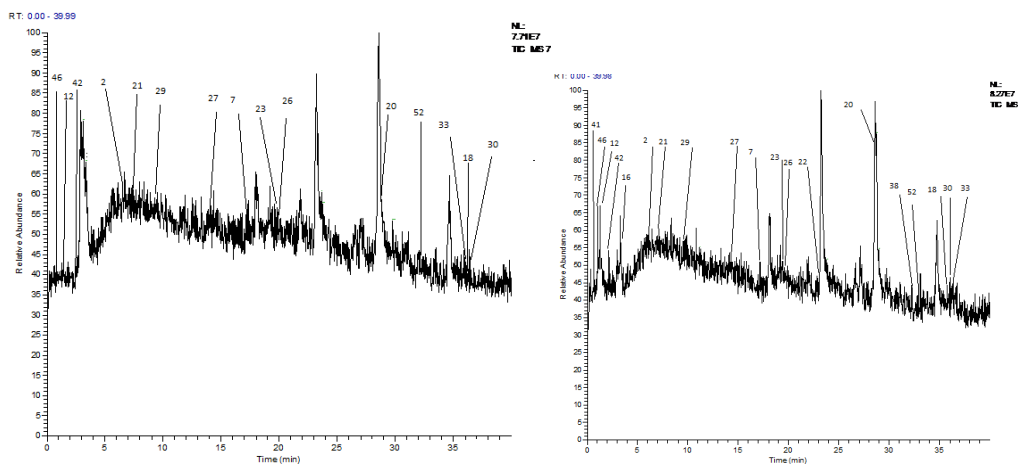
Napomena: a -methanolni, b-etilacetatni, c-heksanski ekstrakti.

U ekstraktima *M. croatica* identifikovano je 35 jedinjenja. Od tih 35, po 29 ili 80,55% je zastupljeno u *M. croatica* iz prirode odnosno u biljnom materijalu sakupljenom tokom gajenja u uslovima *in vitro*. Jedinjenja koja su zastupljena i u jednim i u drugim uzorcima čine 65,74%. Jedinjenja koje se nalaze samo u biljkama *M.*

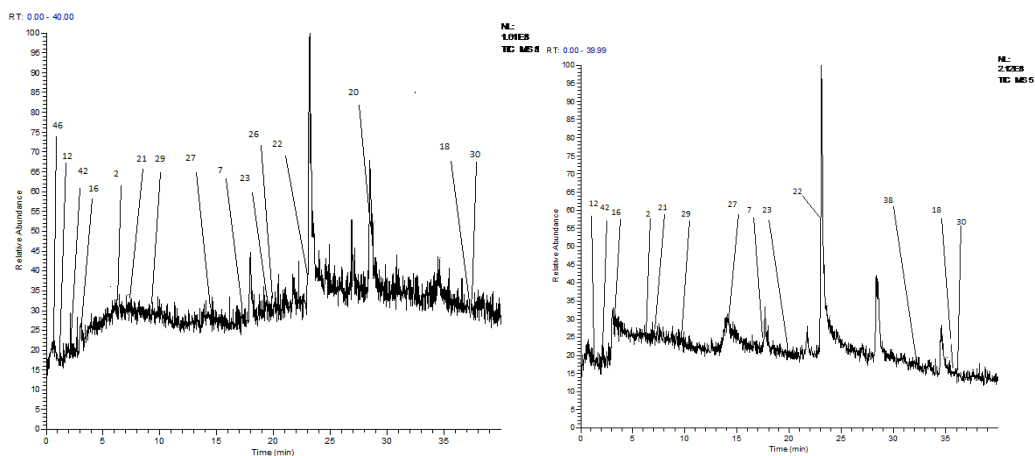
croatica sa prirodnih staništa i ne nalaze se u uzorcima iz kulture *in vitro*, i obrnuto, jedinjenja koja su identifikovana samo u uzorcima dobjenim gajenjem *in vitro* čine po 17,14%. U metanolnim ekstraktima 57,14% čine jedinjenja zajednička za prirodni i kultivisan biljni materijal. Etilacetatom je ekstrahovan manji broj jedinjenja, od kojih je 90,48% zajedničkih. Heksanom je takođe ekstrahovano manje jedinjenja i 80,55% tih jedinjenja bilo je zajedničko za uzorke *M. croatica* koji su različitog porekla (Tabela 13).



Grafik 4. Totalni jonski hromatogrami metanolnih ekstrakata *M. croatica* poreklom iz prirode (levo) i poreklom od izdanaka nakon 4 nedelje rasta u kulturi *in vitro*; brojevi jedinjenja odgovaraju brojevima iz tabele 13.



Grafik 5. Totalni jonski hromatogrami etilacetatnih ekstrakata *M. croatica* poreklom iz prirode (levo) i poreklom od izdanaka nakon 4 nedelje rasta u kulturi *in vitro*; brojevi jedinjenja odgovaraju brojevima iz tabele 13.



Grafik 6. Totalni jonski hromatogrami heksanskih ekstrakata *M. croatica* poreklom iz prirode (levo) i poreklom od izdanaka nakon 4 nedelje rasta u kulturi *in vitro*; brojevi jedinjenja odgovaraju brojevima iz tabele 13

Tabela 13. Jedinjenja identifikovana u ekstraktima *M. croatica* poreklom iz prirode i kulture *in vitro*, na osnovu poredjenja HRMS spektara sa literaturnim podacima

Broj jedinjenja	Jedinjenje	<i>M. croatica</i> priroda	<i>M. croatica</i> <i>in vitro</i>	Literatura
1.	Diosmetin	-	-	[345]
2.	Teukrin G	+ ^{a,b,c}	+ ^{a,b,c}	[345]
3.	Di-O-galoil- β -D-kopiranozid	-	-	[345]
4.	Eriocitrin	+ ^a	-	[135]

5.	Dihidrolanosterol	+ ^a	-	[135]
6.	Ruzmarinska kiselina	-	-	[345]
7.	Diosmetin-7-O-glikozid	+ ^{a,b}	+ ^{a,b,c}	[345]
8.	Alisol C	-	-	[62]
9.	Alisol B	-	-	[54]
10.	Atraktilenolid II	-	-	[62]
11.	Peoniflorin	-	-	[62]
12.	Trans-cimetna kiselina	+ ^{a, b, c}	+ ^{a, b, c}	[345]
13.	Vanilinska kiselina	+ ^a	+ ^a	[345]
14.	Dihidroksimetoksiflavon glikozid	+ ^a	-	[292]
15.	Feruličnakiselina	-	-	[62]
16.	Apigenin	+ ^c	+ ^{a,b,c}	[305]
17.	5β-Holestani-3α,7α,12α,25-tetrol	-	-	[135]
18.	Riligustilid	+ ^{a, b, c}	+ ^{a, b, c}	[62]
19.	Alisol C 23-acetat	-	-	[62]
20.	Alisol F	+ ^{a, b, c}	+ ^{a, b}	[62]
21.	C ₂₁ H ₃₃ O ⁺	+ ^{a, b, c}	+ ^{a, b, c}	[62]
22.	Izomaltopeoniflorin	+ ^{a, c}	+ ^{b, c}	[62]
23.	Diosmetin-6-C-glukozid	+ ^{a, b, c}	+ ^{a, b, c}	[182]
24.	Teuflin	-	+ ^a	[345]
25.	Teucidin	-	+ ^a	[345]

26.	Kvercetin-3-O-ramnozid	-	-	[305]
27.	Galna kiselina monohidrat	+ ^{a,b,c}	+ ^{a,b,c}	[345]
28.	Salvinorin E	-	-	[206]
29.	Salvinorin C	+ ^{a, b, c}	+ ^{b, c}	[206]
30.	[C ₁₈ H ₁₂ O ₃ -Na] ⁺	+ ^{a,b,c}	+ ^{a,b,c}	[206]
31.	Kamferol-3-O-ramnozid	-	+ ^a	[53]
32.	Cikloartenol trans-ferulat	+ ^a	-	[53]
33.	C ₂₇ H ₄₁ O ₂	+ ^{a, b}	+ ^{a, b}	[179]
34.	C ₂₁ H ₃₁ ⁺	-	-	[179]
35.	5β-Holestan-3α7α12α25-tetrol	+ ^a	+ ^a	[135]
36.	5,2'-Dihidroksi-6,7,8,6'- tetrametoksiflavon	-	-	[183]
37.	Heksametoksiflavon	-	-	[345]
38.	monohidroksi-heksametoksiflavon	+ ^{a,b}	+ ^{a, b, c}	[345]
39.	2Z-(Heptadek-12-enil)-4-hidroksi- 3,4,7,8-tetrahidro-2H-hromen-5(6H)- one	-	-	[335]
40.	Norisoboldin	-	-	[61]
41.	apigenin-7-O-glukuronid	-	+ ^{a, b}	[61]
42.	luteolin-7-O-rutinozid	+ ^{a, b, c}	+ ^{a, b, c}	[181]
43.	kamferol-3-O –glukozid (aduct with Na)	-	-	[181]

44.	Epikatehingalat	-	+ a	[186]
45.	Dihidroksihoolesterol	-	-	[135]
46.	Albiflorin	+ ^{a,b,c}	+ ^{a,b}	[61]
47.	7 α ,27-Dihidroksihoolesterol	+ ^a	-	[135]
48.	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	+ ^{a,b,c}	+ ^{a,b,c}	[54]
49.	Kvarcetin-3-O- ramnozid	+ ^{a, b, c}	+ ^{a, b}	[345]
50.	C ₁₈ H ₁₂ O ₃	+ ^{a, b, c}	+ ^{a, b, c}	[62]
51.	20-hidroksiekdizon	+ ^{a, b, c}	+ ^{a, b}	[292]
52.	dihidroksimetoksiflavnon	+ ^{a,b}	+ ^{a,b}	[20]
53.	Galna kiselina	-	+ ^a	[183]

Napomena: a -metanolni, b- etilacetatni, c-heksanski ekstrakti.

4.7. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA *M. pulegium* i *M. croatica*

Za određivanje i poređenje antioksidativnih odlika *M. pulegium* i *M. croatica* korišćeni su metanolni ekstrakti biljaka iz prirode i izdanaka gajenih u kulturi *in vitro*. Za procenu antioksidativnih osobina primenjeno je pet različitih metoda i to: procena aktivnosti za hvatanje slobodnih radikala (DPPH i ABTS), ukupna redukciona moć primenom Fe(III) /Fe(II) sistema, određivanje sadržaja ukupnih fenola i flavonoida.

Kada se uporedi metanolni ekstrakt biljaka *M. pulegium* iz prirode sa ekstraktom izdanaka koji su gajeni u kulturi *in vitro*, uočava se 16,6% razlike u pogledu aktivnosti hvatanja slobodnih radikala DPPH metodom. Razlike u sadržaju flavonoida su 6,14%. Vrednost dobijena ABTS metodom je veća za 26,87% za ekstrakt dobijen od izdanaka gajenih u uslovima *in vitro* u odnosu na izdanke iz prirodne sredine. Ukupna redukciona moć za izdanke propagirane u uslovima *in vitro* ima veću vrednost za 29% u odnosu na biljke iz prirode. Takođe je veći i sadržaj ukupnih polifenola. Njih je 55,68% više u uzorku izdanaka koji su gajeni u uslovima *in vitro* (Tabela 14).

Sve metode za procenu antioksidativne aktivnosti izuzev DPPH metode ukazuju da postoji razlika u antioksidativnoj aktivnosti između metanolnog ekstrakta biljaka *M. croatica* poreklom iz prirode i metanolnog ekstrakta izdanaka propagiranih u kulturi *in vitro*. Razlika u sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala je mala i iznosi 12,73%. ABTS metodom su dobijene veće vrednosti ekstrakta poreklom od izdanaka propagiranih u uslovima *in vitro* u odnosu na biljke iz prirodne sredine i to za 84,21%. Sadržaj flavonoida je za 43,44% veći u uzorku iz prirode u odnosu na uzorak iz kulture. Ukupna redukciona moć određena za izdanke koji su kultivisani u uslovima *in vitro* znatno premašuje vrednost dobijenu za biljke iz prirode i to u iznosu od 86,84%. Najveća razlika je na nivou sadržaja ukupnih polifenola. Njih u izdancima gajenim u uslovima *in vitro* ima 136% više nego u biljkama na prirodnim staništima (Tabela 14).

Tabela 14. Antioksidativna svojstva metanolnih ekstrakata *M. pulegium* i *M. croatica* određena metodama: DPPH, ABTS, ukupna redukciona moć, ukupan sadržaj fenola i flavonoida.

Biljni materijal	DPPH (%)	ABTS	Ukupna redukciona moć	Ukupni fenoli	Flavonoidi
<i>M. pulegium</i> priroda	4,64±0,29	0,67±0,03	243,82±3,11	48,96±1,32	37,78±1,42
<i>M. pulegium</i> <i>in vitro</i>	3,89±0,25	0,85±0,02	314,55±9,54	76,22±0,81	35,46±0,21
<i>M. croatica</i> priroda	3,30±0,34	0,57±0,02	137,22±8,28	10,61±0,31	33,06±1,18
<i>M. croatica</i> <i>in vitro</i>	2,88±0,03	1,05±0,01	256,38±15	25,04±0,66	18,70±0,72

BHT 3.18±0,02% pri koncentraciji 1 mg/mL

4.8. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA *M. pulegium* I *M. croatica*

U ovoj analizi izvršeno je poređenje antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata vrsta roda *Micromeria* dobijenih od nadzemnih delova biljaka prikupljenih iz prirode u vegetativnoj fazi, i nakon 4 nedelje kulture *in vitro* na MS hranljivoj podlozi bez fitohormona. Antimikrobna aktivnost je određena mikro-dilucionom metodom. Korišćeni test mikroorganizmi su najčešći bakterijski patogeni sojevi, po tri iz grupe Gram (+) i Gram (-) bakterija. Ekstrakti su rastvarani u 30% metanolu i negativna kontrola je pokazala da, u okviru testiranih koncentracija, rastvarač metanol nije delovao ni na jedan soj. Metanolni ekstrakti *M. pulegium* i *M. croatica* delovali su na sve testirane sojeve, ali znatno slabije u odnosu na tri referentna antibiotika.

4.8.1. Antimikrobna aktivnost ekstrakata biljne vrste *Micromeria pulegium*

Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije ekstrakata *M. pulegium* su bile u opsegu od MIC/MBC=12,57-68,70 mg/mL ekstrakta, sa izuzetkom soja *P. aeruginosa* na koga baktericidno nisu delovale ni najviše testirane koncentracije oba ekstrakta. Gram (+) bakterije su bile malo osetljivije u odnosu na grupu Gram (-) bakterija. Najrezistentniji je bio soj *P. aeruginosa*, za koji su dobijene vrednosti MIC/MBC=25,13/>50,25 mg/mL za ekstrakt poreklom od biljaka iz prirode i 68,70/>68,70 mg/mL, za ekstrakt poreklom od *in vitro* propagiranih izdanaka. Najosetljiviji je bio soj *S. aureus* na koga su oba ekstrakta delovala u najnižim koncentracijama (MIC=MBC=12,57 mg/mL; 17,13 mg/mL respektivno) (Tabele 15 i 16).

Nije zabeležena značajna razlika u delovanju metanolnog ekstrakta koji je dobijen od biljaka *M. pulegium* iz prirode i izdanaka odgajenih u kulturi *in vitro*.

Tabela 15. Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata *M. pulegium* (MIC/MBC u mg/mL) na Gram (-) bakterije

Metanolni ekstrakt <i>M. pulegium</i>	Gram (-) bakterije		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>M. pulegium</i> (priroda)	25,13/50,25	25,13/25,13	25,13/>50,25
<i>M. pulegium</i> (in vitro)	34,25/68,70	17,13/34,25	68,70/>68,70
*Streptomycin	16,0/16,0	4,0/4,0	8,0/8,0
*Chloramphenicol	8,0/16,0	4,0/8,0	16,0/4,0
*Tetracyclin	0,5/2,0	1,0/8,0	4,0/32,0

* Antibiotici korišćeni kao pozitivna kontrola (MIC/MBC u µg/mL)

Tabela 16. Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata *M. pulegium* (MIC/MBC u mg/mL) na Gram (+) bakterije

Metanolni ekstrakt <i>M. pulegium</i>	Gram (+) bakterije		
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>M. pulegium</i> (priroda)	50,25/>50,25	12,57/12,57	12,57/25,13
<i>M. pulegium</i> (in vitro)	17,13/34,25	17,13/17,13	17,13/68,7
*Streptomycin	0,5/0,5	0,5/0,5	1,0/1,0
*Chloramphenicol	1,0/4,0	1,0/8,0	8,0/8,0
*Tetracyclin	0,5/0,5	1,0/1,0	1,0/2,0

* Antibiotici korišćeni kao pozitivna kontrola (MIC/MBC u µg/mL)

4.8.2. Antimikrobna aktivnost ekstrakata biljne vrste *Micromeria croatica*

Ekstrakti biljaka vrste *M. croatica* iz prirode su, protiv testiranih sojeva bakterija ispoljili minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije u opsegu MIC/MBC=9,06-72,50 mg/mL. Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije ekstrakata izdanaka *M. croatica* gajenih u uslovima *in vitro* su bile u opsegu od MIC/MBC=10,13-40,50 mg/mL, izuzimajući sojeve *E. coli*, *P. aeruginosa* i *B. cereus* na koje baktericidno nije delovala ni najviša testirana koncentracija ekstrakta (Tabele 17 i 18). Najosetljiviji je

bio soj *S. aureus* za koji su dobijene vrednosti MIC/MBC=18,13/36,25 za ekstrakt poreklom od biljaka iz prirode i MIC/MBC=10,13/20,25 mg/mL za ekstrakt poreklom od *in vitro* kultivisanih izdanaka. Sojevi *E. coli* i *P. aeruginosa* su bili najrezistentniji i dobijene vrednosti identične za oba soja su MIC=MBC=72,50 mg/mL za ekstrakt poreklom od biljaka iz prirode i MIC/MBC=40,50/>40,50 za ekstrakt poreklom od izdanaka propagiranih *in vitro*. Nije zabeležena značajna razlika u delovanju metanolnih ekstrakata biljaka *M. croatica* iz prirode i izdanaka kultivisanih u kulturi *in vitro*.

Tabela 17. Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata *M. croatica* (MIC/MBC u mg/mL) na Gram (-) bakterije

Metanolni ekstrakt <i>M. croatica</i>	Gram (-) bakterije		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>M. croatica</i> (priroda)	72,50/72,50	36,25/72,50	72,50/72,50
<i>M. croatica</i> (<i>in vitro</i>)	40,50/>40,50	20,25/40,50	40,50/>40,50
*Streptomycin	16.0/16.0	4.0/4.0	8.0/8.0
*Chloramphenicol	8.0/16.0	4.0/8.0	16.0/4.0
*Tetracyclin	0,5/2,0	1,0/8,0	4,0/32,0

* Antibiotici korišćeni kao pozitivna kontrola (MIC/MBC u µg/mL)

Tabela 18. Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata *M. croatica* (MIC/MBC u mg/mL) na Gram (+) bakterije

Metanolni ekstrakt <i>M. croatica</i>	Gram (+) bakterije		
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>M. croatica</i> (priroda)	9,06/72,50	18,13/36,25	36,25/72,50
<i>M. croatica</i> (<i>in vitro</i>)	10,13/>40,50	10,13/20,25	20,25/40,50
*Streptomycin	0,5/0,5	0,5/0,5	1,0/1,0
*Chloramphenicol	1,0/4,0	1,0/8,0	8,0/8,0
*Tetracyclin	0,5/0,5	1,0/1,0	1,0/2,0

* Antibiotici korišćeni kao pozitivna kontrola (MIC/MBC u µg/mL)

5. DISKUSIJA

5.1. PROPAGACIJA *in vitro* VRSTA *M. pulegium* i *M. croatica*

Gajenje retkih i ugroženih biljnih vrsta, metodom kulture *in vitro*, posljednjih godina je sve zastupljeniji način zaštite *ex situ*. Veliki broj predstavnika Lamiaceae, gajen je metodom kulture biljnih tkiva *in vitro*, uglavnom je reč o vrstama koje zahvaljujući svojim biološkim aktivnostima, predstavljaju važan izvor prirodnih fitofarmaceutskih jedinjenja.

Uspeh regeneracije biljaka *in vitro* zavisi od više faktora: sastava hranljive podloge, stadijuma razvića biljke, vrste kulture *in vitro* kao i izbora primarnog eksplantata za uspostavljanje kulture.

Vrsta *M. pulegium* uvedena je u kulturu biljnih tkiva *in vitro*, postavljanjem aseptičnih segmenata stabla sa jednim nodusom, na hranljivu podlogu bez fitohormona. Primarni eksplantati uzorkovani su sa izdanaka biljaka iz prirode u ranoj vegetativnoj fazi. Upotreba segmenata stabla sa jednim nodusom, za regeneraciju biljaka u cilju postizanja masovne produkcije, smatra se pogodnom metodom za brojne vrste Lamiaceae (Dode i sar., 2003). To je istovremeno najpouzdaniji metod za dobijanje uniformnog biljnog materijala (George and Sherrington, 1984). Korišćenje segmenata sa jednim nodusom ima izvesne prednosti nad korišćenjem aksilarnih pupoljaka kao eksplantata. Naime, oni se lakše multipliciraju nego aksilarni pupoljci i formiranje pupoljaka na njima je brže, nego na aksilarnim pupoljcima (Zuzarte i sar., 2010).

Kao primarni eksplantati, za uspostavljanje *in vitro* kulture *M. croatica*, uzeti su segmenti stabla sa jednim nodusom, sa klijanaca dobijenih *in vitro*. Isti način inicijacije kulture postignut je i kod *Clinopodium odorum* (Diaz i sar., 2012).

Klijavost semena *M. croatica* bila je 89% na MS podlozi bez regulatora rastenja. Upotreba bazalne MS hranljive podloge daje dobre rezultate za *in vitro* klijanje mnogih vrsta (Molia i Kwapata, 2000), uključujući i vrste Lamiaceae (Ozudogru i sar., 2011; Ramak i sar., 2011; Nordine i sar., 2013 a; Diaz i sar., 2012).

Semena drugih vrsta familije Lamiaceae, kao što su *Salvia sclarea* (Taherehghanbari i sar., 2012), *Origanum minutiflorum* (Özkum 2007), *Lavandula angustifolia*, *L. latifolia* (Al-Bakhit i sar., 2007), *Agastache rugosa* (Zielinska i sar.,

2011) i *Thymus vulgaris* (Affonso i sar., 2009) takođe pokazuju veoma dobru klijavost na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja.

Čvrsta semenjača manje je propustljiva za prodiranje agenasa za površinsku sterilizaciju kao što je hipohlorit, pa je sterilizacija semena često invazivnija nego sterilizacija vegetativnih tkiva (Akin-Idowu i sar., 2009). Zbog toga sredstva za sterilizaciju zavisno od vrste i trajanja sterilizacije mogu smanjiti procenat klijanja semena. Iz tog razloga su semena *M. croatica* nakon sterilizacije, a pre postavljanja na MS hranljivu podlogu bila tretirana sa KNO_3 . Pokazalo se da su jedinjenja koja sadrže azot efikasna u prekidanju dormancije i indukciji klijanja semena (Tang i sar., 2008). KNO_3 je značajan za reaktivaciju metaboličkih procesa u semenima i može izazvati biosintezu auksina što rezultira rastom embriona (Khan i sar., 1999).

Gotovo da nema podataka o klijavosti semena vrsta roda *Micromeria*. Jedini literaturni podatak se odnosi na klijavost endemične, retke i ugrožene vrste *Micromeria cypria* Kotschy koja je evidentirana u flori Kipra. Ova vrsta maksimalnu klijavost od 60% postiže na relativno niskim temperaturama, oko 15 °C, pri čemu je vreme potrebno da isklija 50 % semena 9 dana. Klijanje na nižim temperaturama često je svojstveno biljkama Mediteranskog podneblja. Klijavost različitih vrsta Lamiaceae diktirana je uslovima staništa biljke, koji zapravo odgovaraju ekološkim faktorima pod kojim data vrsta raste. Obzirom da ovo istraživanje nije bilo fokusirano na ispitivanje klijavosti semena dve vrste roda *Micromeria*, fizičko-hemijski parametri nisu varirani u cilju eksperimentalnog poboljšanja klijavosti pomenute vrste (Kadis i sar., 2010).

Formiranje pupoljaka i izduživanje izdanaka na eksplantatima dve vrste *Micromeria* u kulturi *in vitro* praćeno je postavljanjem eksplantata na MS hranljivu podlogu bez regulatora rastenja i na podloge sa različitim citokininima (BA ili kinetin) u prisustvu ili bez IAA. Kombinacija citokinina sa niskom koncentracijom auksina često podstiče razviće pupoljaka na eksplantatima (Tejavathi i Indira, 2011). Citokinin sa auksinom omogućava prevazilaženje apikalne dominacije, indukuje razviće pupoljaka i oslobađa bočne pupoljke dormancije (Özkum, 2007). Za kulturu pupoljaka često je potrebno prisustvo citokinina u podlozi jer je produkcija citokinina u pupoljcima zanemarljivo mala u poređenju sa korenima, koji je primarno mesto sinteze citokinina (Kodo i Okozava, 1980). Citokinini regulišu mnoge fiziološke, metaboličke i biohemijske procese u biljkama. Nije sasvim jasno da li egzogeno primenjeni citokinini

utiču direktno na morfogenezu ili posredno, delujući na endogene citokinine i druge regulatore rastenja, na njihovu *de novo* sintezu, hidrolizu, mobilizaciju, aktivaciju, konjugaciju ili degradaciju (Arigita i sar. 2005). Vrednost optimalne koncentracije fitohormona u hranljivoj podlozi, koja je potrebna za rastenje kulture, zavisi od endogene koncentracije fitohormona u eksplantatu, vrste biljnog organa, genotipa i ontogenetske faza razvoja (Suresh i Ajay, 2004). Iako citokinini mogu da stimulišu formiranje adventivnih pupoljaka, oni su primećeni samo na nekoliko izdanaka *M. pulegium* gajenih na MS podlozi sa IAA i 3 μ M kinetina. Na izdancima *M. croatica* bez obzira na kojoj hranljivoj podlozi su gajeni, nije došlo do formiranja adventivnih pupoljaka.

Formiranje pupoljaka na eksplantatima *M. pulegium* bilo je 100% na MS podlozi bez fitohormona i MS podlogama sa višim koncentracijama citokinina sa ili bez IAA. Regenerativni odgovor je bio bolji na podlogama koje su sadržale BA. Slično kao kod *M. pulegium* Rahman (2013) beleži da je kod *Mentha viridis* formiranje pupoljaka na eksplantatima bilo 100% na kombinovanoj podlozi MS koja sadrži BA i IAA.

Formiranje pupoljaka na eksplantatima *M. croatica* nije ostvareno 100% ni na jednoj hranljivoj podlozi. Za razliku od *M. pulegium* eksplantati *M. croatica* formirali su veći broj pupoljaka na podlogama sa relativno niskom koncentracijom (1 μ M) citokinina, pri čemu je kinetin bio efikasniji od BA. Dobar regenerativni odgovor u kulturi *in vitro* u prisustvu kinetina primećen je i kod lavande (Al-Bakhit i sar., 2007).

Citokinini zavisno od vrste i koncentracije različito utiču na broj pupoljaka na eksplantatima *M. pulegium* i *M. croatica*. Prisustvo regulatora rastenja u hranljivoj podlozi u većoj meri utiče na formiranje pupoljaka na eksplantatima *M. pulegium* nego *M. croatica*.

Sa porastom koncentracije BA u hranljivoj podlozi, na eksplantatima *M. pulegium* i *M. croatica* dolazilo je do formiranja većeg broja aksilarnih pupoljaka, dok se ne dostigne optimalna koncentracija, a potom je broj pupoljaka bio manji. Kao i u slučaju *Micromeria*, formiranje većeg broja pupoljaka sa porastom koncentracija BA, zabeleženo je kod *Lavandula pedunculata* (Zuzarte i sar., 2010). U prisustvu kinetina u hranljivoj podlozi, *M. pulegium* se ponaša slično kao i u prisustvu BA. Kod *M. pulegium*, broj pupoljaka na eksplantatima ne zavisi puno od vrste citokinina. Kod *M. croatica* sa porastom koncentracije BA u hranljivoj podlozi, raste broj formiranih

pupoljaka na eksplantatima, dok se sa porastom koncentracije kinetina taj broj smanjuje. Broj formiranih pupoljaka na eksplantatima *M. croatica* zavisi od vrste citokinina u hranljivoj podlozi. Kod *Ocimum gratissimum* je takođe zapaženo da fitohormoni ne dovode do sinhronizovanih efekata na razviće pupoljaka eksplantata tokom gajenja u uslovima *in vitro* (Saha i sar., 2012).

Kod *M. pulegium* BA značajnije doprinosi formiranju pupoljaka nego kinetin. Za razliku od *M. pulegium* citokinini neznatno stimulišu formiranje pupoljaka na eksplantatima *M. croatica*, ali se i pored malog doprinosa, može primetiti da kinetin više nego BA utiče na formiranje pupoljaka. Sinergističko delovanje IAA i BA na formiranje pupoljaka *M. pulegium* je gotovo zanemarljivo i više dolazi do izražaja zajedničko delovanje IAA i kinetina, za razliku od *M. croatica* kod koje podloge sa BA i IAA udruženo doprinose formiranju pupoljaka na eksplantatima, ipak bez statističkog značaja.

Kod *M. pulegium* niske koncentracije oba citokinina (0,1 μM BA ili 0,3 μM kinetina) dovode do formiranja značajno manjeg broja pupoljaka na eksplantatima, a kod *M. croatica* takvo dejstvo imaju niske koncentracije BA i visoke koncentracije kinetina u prisustvu IAA.

Hranljiva podloga MS sa IAA je uticala na dužinu izdanaka obe vrste *Micromeria*, pa su izdanci na eksplantatima gajenim na ovoj podlozi bili kraći od kontrolnih izdanaka. Povećanje koncentracije oba citokinina u hranljivoj podlozi praćeno je tendencijom izduživanja izdanaka *M. pulegium*. Sa porastom koncentracije BA u podlozi do 3 μM dužina aksilarnih pupoljaka *M. croatica* je uglavnom bila veća, a potom se smanjuje. Iako citokinini stimulišu proliferaciju aksilarnih pupoljaka, kod nekih vrsta do izražaja dolazi njihova inhibitorna uloga na izduživanje pupoljaka (van Staden i sar., 2008). Slično se dešava i kod *M. croatica*. Sa porastom koncentracije kinetina u hranljivoj podlozi dužina aksilarnih izdanaka je bila sve manja. Dužina izdanaka *M. pulegium* koji su rasli na MS podlozi sa BA bila je veća nego kod onih koji su gajeni na podlogama sa kinetinom. Za razliku od *M. croatica* kod koje dužini izdanaka kao i njihovom formiranju više doprinosi kinetin nego BA. Dužina izdanaka *M. croatica* varira sa promenom regulatora rastenja na sličan način kao i broj pupoljaka.

Visoke koncentracije citokinina, nisu stimulisale izduživanje izdanaka *M. croatica*. Slično je zabeleženo i kod *Mentha piperita* (Ghanti i sar., 2004) i *Melissa*

officinalis (Tavers i sar., 1996), gde visoke koncentracije citokinina ne stimulišu izduživanje izdanaka.

Na pojedinim izdancima koji su rasli na podlozi sa kinetinom uočeno je formiranje korenova. Kinetin povećava intenzitet transpiracije usled čega se povećava transport kroz provodne elemente i apsorpcija iz podloge što doprinosi razvoju korena (Pospišilova i sar., 2000).

Kod *M. croatica* broj pupoljaka je u korelaciji sa njihovom dužinom, dok je kod *M. pulegium* primećena inverzna relacija između broja i dužine aksilarnih pupoljaka, što znači formiran je manji broj pupoljaka ali veće dužine. Inverzna relacija između broja i dužine pupoljaka nađena kod *M. pulegium* karakteriše i eksplantate *Lavandula pedunculata* koji su gajeni na podlozi sa BA (Zuzarte i sar., 2010).

Produkcija sekundarnih metabolita koji su važni nosioci različitih bioloških aktivnosti obično je intenzivnija kod onih jedinki koje imaju veći prinos biomase (Prins i sar., 2010; Sangwn i sar., 2001). U tom smislu važno je bilo ispitati uticaj regulatora rastenja na biomasu eksplantata *Micromeria*.

Niska koncentracija auksina prisutnog u MS hranljivoj podlozi dovela je do smanjenog prinosa biomase eksplantata *M. croatica*, dok na prinos biomase *M. pulegium* nije uticala značajno.

Nezavisno od prisustva auksina, sa porastom koncentracije BA u hranljivoj podlozi i biomasa eksplantata *M. pulegium* je bila veća. Kod *M. pulegium* BA više doprinosi povećanju biomase nego kinetin, dok je kod *M. croatica* obrnuto. Kao kod *Micromeria pulegium*, kod *Thymus vulgaris* (Affonso i sar., 2009) i *Mentha piperita* (Scravoni i sar., 2006), BA više povećava prinos biomase nego kinetin. Kod *M. croatica* porast biomase eksplantata gajenih na MS podlogama sa BA dolazi do izražaja samo na visokim koncentracijama BA u prisustvu auksina. Sveža i suva masa eksplantata *M. croatica* ima veću vrednost na MS podlozi bez fitohormona, nego na MS podlogama sa BA, što u potpunosti odgovara ponašanju *Coleus forskohlii* Briq. tokom *in vitro* propagacije (Praveena i sar., 2012).

Najveća biomasa eksplantata *M. croatica* ostvarena na podlozi MS sa 0,3 μ M kinetina, ipak ona nije značajno veća od biomase kontrolnih eksplantata. Za razliku od *M. croatica*, najveća biomasa eksplantata *M. pulegium* ostvarena na podlozi MS sa 10 μ M BA, je značajno veća od biomase eksplantata sa kontrolnih i skoro svih preostalih

podloga. To govori da su citokinini u hranljivoj podlozi neophodni za postizanje veće biomase eksplantata *M. pulegium*, dok za *M. croatica* nemaju veliki značaj.

Interesantno je da su iste koncentracije kinetina imale suprotan efekat na broj i dužinu pupoljaka formiranih na eksplantatima dve ispitivane vrste *Micromeria*. Najveći prinos biomase *M. croatica* imali su eksplantati gajeni na podlozi MS sa 0,3 μM kinetina, dok su na toj istoj podlozi eksplantati *M. pulegium* imali mali broj kraćih pupoljaka i najmanji prinos biomase.

Stimulativno delovanje kinetina na prinos biomase zabeleženo je i kod *Mentha arvensis* (Farooqi i sar., 2003). Doprinos kinetina povećanju sveže mase proističe iz njegove uloge da stimuliše diferencijaciju ksilema i razvoj vaskularnog sistema, samim tim povećavajući apsorpciju vode i hranljivih elemenata iz podloge što se odražava povećanim rastom iskazanim kroz biomasu (Sorokin i Thiamann, 1964).

Prisustvo kinetina visoke koncentracije (30 μM) i 0,57 μM IAA dovelo je smanjenog prinosa biomase eksplantata *M. croatica*, na toj podlozi eksplantati *M. croatica* imali su najmanji broj istovremeno najkraćih pupoljaka, usled čega je mali prinos biomase. Moguće je da je u datoj kombinaciji fitohormona auksin stimulisao sintezu etilena, čije prisustvo inhibira rast pupoljaka (Nešković i sar., 2003). Kod nekih vrsta je primećeno da kinetin visoke koncentracije inhibira rast pupoljaka, zbog toga što smanjuje količinu fosfora a povećava sadržaj kalijuma u listovima što ima za posledicu inhibiran rast pupoljaka (Kastori i sar., 2013). Na istoj MS podlozi sa 0,57 μM IAA i 30 μM kinetina, na eksplantatima *M. pulegium*, formirali su se pupoljci koji prevazilaze dužinu i broj pupoljaka eksplantata sa MS podloge bez fitohormona, i time doprinose velikom prinosu biomase. Porast dužine pupoljaka može da se pripiše svojstvu kinetina da intenzivira ćelijsku deobu u apikalnom meristemu i kambijumu (Mazher i sar., 2011). Prisustvo auksina stimuliše formiranje vaskularnih elemenata (Nešković i sar., 2003) čime se povećava apsorpcija hranljivih elemenata iz podloge, što pozitivno utiče na rast izdanaka i prinos biomase. Za razliku od *M. pulegium* ne postoji sinergističko delovanje auksina i kinetina koje bi doprinelo biomasu eksplantata *M. croatica*.

Kod *M. pulegium* BA više doprinosi porastu biomase u odnosu na kinetin, kao i kod *Thymus vulgaris* (Affonso i sar., 2009).

Sumirajući rezultate može se zaključiti da su se *M. pulegium* i *M. croatica* različito ponašale tokom gajenja u kulturi *in vitro*. U izvesnoj meri postoji podudarnost

u regenerativnom odgovoru *M. pulegium* i *M. croatica* u prisustvu BA u hranljivoj podlozi. Razlike na nivou vrste dolaze do izražaja tokom gajenja eksplantata na podlogama sa kinetinom. Razviću *M. pulegium* u kulturi više pogoduje BA, za razliku od *M. croatica* čiji se eksplantati neznatno bolje razvijaju u prisustvu kinetina.

I pored toga što je 100% eksplantata *M. pulegium* formiralo pupoljke na MS podlozi bez regulatora rastenja, veći broj dužih aksilarnih pupoljaka formirao se na eksplantatima u prisustvu regulatora rastenja u hranljivoj podlozi. Činjenica da je formiranje pupoljaka na eksplantatima *M. pulegium* znatno bolje u prisustvu regulatora rastenja (posebno BA), ukazuje da postoji potreba eksplantata za morfogogenetskom indukcijom. Gostin (2008) nalazi da je na sličan način prisustvo BA u hranljivoj podlozi neophodno za formiranje pupoljaka na eksplantatima *Salvia officinalis* i pored toga što se na njima formiraju pupoljci i na podlozi bez regulatora rastenja.

Očigledno je da egzogeno dodati regulatori rastenja nisu značajno doprineli obrazovanju pupoljaka na eksplantatima *M. croatica* pa se može reći da nisu neophodni za normalan razvoj. Sastav MS podloge bez regulatora rastenja sadrži proporciju neorganskih jedinjenja koja zadovoljava nutritivne i fiziološke potrebe *M. croatica* u uslovima *in vitro*.

Da bi regeneracija biljaka u kulturi *in vitro* bila potpuna, potrebno je ožiliti izdanke koji su se formirali i rasli u uslovima *in vitro* (Goncalves i Romano, 2013). Ožiljavanje izdanaka je najkritičniji korak u formiranju kompletnih biljaka. Pošto regeneracija korenovog sistema zahteva izmene u metabolizmu izdanaka, često se dešava da je neophodno prisustvo regulatora rastenja u hranljivoj podlozi (Moncousin, 1991).

Neki predstavnici Lamiaceae gajeni u kulturi *in vitro*, kao što su *Cunila incisa* (Agostini i Echeverrigaray, 2006), *Salvia guaranitica* (Echeverrigaray i sar., 2010) i *Thymus broussonetii* (Nordine i sar., 2014) u manjoj ili većoj meri spontano formiraju korenovena MS hranljivoj podlozi bez fitohormona. Interesantno je da je kod brojnih predstavnika familije Lamiaceae kao što su *Ocimum kilimandscharicum* (Saha i sar., 2010), *Mentha viridis* (Rahman i sar., 2013), *M. piperita* (Sunadakumari i sar., 2004), *Pogostemon cablin* (Kumara Swamy i Anuradha 2010), *Thymus satureioides* Coss. (Nordine i sar., 2013 b), *T. piperilla* (Stahl-Biskup i Saéz 2002), *T. vulgaris* (Ozudogru i sar., 2011), *Orthosiphon aristatus* (Jayakumar i Ramalingam 2013), *Coleus amboinicus*

(Arulanandam i sar., 2011) i različite vrste *Lavanda* (Goncalves i Romano, 2013; Andrade i sar., 1999) frekvencija ožiljavanja veća ako se izdanci ožiljavaju na MS podlozi sa manjom koncentracijom mineralnih soli. Driver i Suttle (1987) ističu da redukovana koncentracija makronutrijenata pospešuje ožiljavanje verovatno zato što je koncentracija azotnih jona potrebnih za ožiljavanje niža od koncentracije koja je potrebna za formiranje i rast izdanaka.

Polazeći od toga da je ožiljavanje brojnih vrsta Lamiaceae bilo bolje na podlogama MS/2 nego na MS, za ožiljavanje *Micromeria* korišćene su podloge MS/2 sa redukovanim sadržajem makro- i mikronutrijenata. Literaturni podaci pokazuju da sastav hranljive podloge na kojoj su formirani izdanci utiče na fazu ožiljavanja. Fitohormoni prisutni u kulturi u fazi inicijacije, utiču u velikoj meri na druge etape *in vitro* propagacije (Sanches-Gras i Calvo 1996). Izdanci koji su se formirali na podlogama sa kinetinom formirali su više korenova u fazi ožiljavanja, nego izdanci koji su se formirali na podlogama sa BA (Bennett i sar., 1994). Da bi se izbegao uticaj egzogenih fitohormona korišćenih za indukciju i bolji razvoj izdanaka, za ožiljavanje su korišćeni isključivo izdanci koji su se formirali na eksplantatima gajenim na MS podlogama bez regulatora rastenja.

Iako ožiljavanje najviše zavisi od genotipa (Ioio i sar., 2008) ono se može dodatno stimulisati dodavanjem regulatora rastenja u hranljivu podlogu. Najčešće su to auksini IAA, NAA i IBA. Auksini stimulišu ćelijsku deobu, rastenje ćelija korena i stabla, obrazovanje kalusa, formiranje adventivnih korenova, a inhibiraju rast i razviće adventivnih i bočnih izdanaka i odgovorni su za apikalnu dominaciju (Nešković i sar., 2003). Niske koncentracije auksina pospešuju obrazovanje adventivnih korenova. Visoke koncentracije sputavaju nastanak adventivnih korenova, i stimulišu formiranje kalusa (Marić, 1995).

Na podlogama koje su sadržale upola manju količinu makro- i mikro soli evidentirano je ožiljavanje i jedne i druge vrste *Micromeria*. Slično je zabeleženo i prilikom ožiljavanja *Salvia brachyodon* (Mišić i sar., 2006), ali je odgovor na MS/2 bio slabiji nego kod *Micromeria*.

Procenat ožiljenih izdanaka *M. pulegium* bio je od 8,33% do 54%. Na podlozi MS/2 bez fitohormona ožiljeno je 28,33 % izdanaka što sugerise da postoji potreba za regulatorom rastenja koji će stimulisati ožiljavanje. Najveći procenat ožiljavanja

izdanaka (%) ostvaren je na podlozi MS/2 sa 1 mg/l IAA. Stimulativno delovanje IAA na ožiljavanje nađeno je i kod *Thymus broussonetii* (Nordine i sar., 2014).

Procenat ožiljenih izdanaka *M. croatica* bio je od 45 do 81,67%. Na kontrolnoj podlozi, ožiljavanje je bilo prilično zadovoljavajuće (73,33%). Kako je samo na dvema hranjivim podlogama sa auksinom, procenat ožiljavanja veći nego na kontrolnoj podlozi bez fitohormona, može se reći da auksini relativno malo doprinose ožiljavanju aksilarnih izdanaka *M. croatica* i da redukovani sadržaj soli u MS podlozi u velikoj meri zadovoljava morfogenetske i fiziološke potrebe izdanaka. Dok kod *M. pulegium* osim IAA, ožiljavanje donekle stimuliše i NAA, kod *M. croatica* od tri korišćena auksina samo IAA relativno niskih koncentracija stimuliše ožiljavanje. Zajedničko za obe vrste *Micromeria*, je da prisustvo IBA različitih koncentracija u MS/2 podlogama, nije efikasno uticalo na ožiljavanje.

Stimulišući efekat IAA na ožiljavanje prisutan je i kod drugih Lamiaceae. Maksimalno formiranje korenova *Mentha viridis* postignuto je na podlozi MS/2 sa IAA (1,5 mg/l) (Rahman i sar., 2013). Ožiljavanje *Thymus piperelle* takođe je stimulirano u prisustvu IAA (Shabnum i Wagay 2011). Kao kod *Micromeria*, prisustvo IAA u podlozi MS/2 stimuluše ožiljavanje *Pogestemon cablin* (Kumara i sar., 2010). Kod *Coleus amboinicus* najbolje ožiljavanje od 90% je na MS/2 sa 0,4 mg/l IAA (Arulanandam i sar., 2011). Kod *Thymus vulgaris* 100% ožiljavanje ostvareno je na svim podlogama koje su sadržle IAA promenljive koncentracije (Affonso i sar., 2009).

Upoređujući međusobno ishod ožiljavanja izdanaka *Micromeria* na podlogama sa različitim auksinima, zapaža se da je kod *M. pulegium* ono najslabije na podlogama sa IBA, a kod *M. croatica* na podlogama sa NAA. Da prisustvo NAA u hranljivoj podlozi ne deluje efikasno na ožiljavanje, zabeleženo je kod *Salvia brachyodon* (Mišić i sar., 2006), *S. fruticosa* (Arikat i sar., 2004), *S. valentine* (Cuenca i Amo-Marco 2000). Inhibitorno delovanje NAA na ožiljavanje nađeno je kod *Lavandula latifolia* (Sanches-Gras i Calvo 1996). Manja stopa ožiljavanja izdanaka u prisustvu NAA i IBA, nije univerzalna pojava. Za razliku od *Micromeria* kod nekih usnatica kao što su *Dracocephalum kotschy* (Otroshy i Moradi, 2011), *Thymus satureioides* Coss. (Nordine i sar., 2013 b), *Salvia stenophylla* (Musarurwa i sar., 2010), *Melissa officinalis* (Shakeri i sar., 2013), *Ocimum basilicum* (Begum i sar., 2002), *Mentha piperita* (Ghanti i sar., 2004) NAA stimuliše ožiljavanje. Takođe neke vrste kao što su: *Salvia fruticosa* (Arikat

i sar., 2004), *Thymus hyemalis* (Nordine i sar., 2013 a), *Orthosiphon aristatus* (Jayakumar i Ramalingam 2013), *Isodon wightii* (Thirugnanasampandan i sar., 2009), *Ocimum basilicum* (Siddique and Anis, 2008), *Coleus blumei* (Rani i sar., 2006), *Mentha viridis* (Raja i Arockiasamy 2008), *Majorana hortensis* Moench (Tejavathi i Padma 2012), *Ocimum gratissimum* (Saha i sar., 2012) i *Satureja khuzistanica* (Ramak 2011) preferiraju IBA za ožiljavanje.

Na različite odgovore u ožijavanju koji se javljaju među vrstama utiču različiti faktori. Osim genotipa, tome doprinose i razlike u odnosu endogenih fitohormona auksina i citokinina, kao i osetljivost tkiva da absorbuje ili koristi egzogeni auksin (de Klerk, 2002).

Inicijacija korenova na izdancima *M. pulegium* i *M. croatica* dešava se 10-15 dana po postavljanju na podlogu. Na dužinu korena izdanaka *Micromeria* uticali su vrsta i koncentracija auksina. Iako se relativno dugi korenovi formiraju na izdancima koji su gajeni u odsustvu regulatora rasteenja, u prisustvu auksina postignut je bolji rast korena.

Prisustvo IAA u različitim koncentracijama u hranljivoj podlozi stimulisalo je izduživnje korena obe vrste. Najbolji efekat na ožiljavanje *M. pulegium* imala je IAA u koncentraciji 1 g/l. Prisustvo IBA ili NAA u hranljivoj podlozi nije delovalo stimulatивно na izduživanje korenova. Na podlozi MS/2 sa najvišom koncentracijom NAA pored rizogeneze došlo je i do pojave kalusa. Ožiljavanje *M. pulegium* gotovo sasvim se podudara sa ishodom ožiljavanja *Salvia guaranitica*. Auksini IBA i NAA ne utiču bitno na dužinu korena izdanaka ove vrste, dok IAA (0,5 mg/l) značajno stimuliše rast korena u dužinu. Takođe, visoke koncentracije NAA dovode do nastanka kalusa kod ove vrste (Echeverrigaray i sar., 2010).

Auksini su donekle slično delovali na izduživanje korena *M. croatica*. IAA u različitim koncentracijama pospešuje izduživanje korena, a najduži korenovi formirani su na izdancima koji su gajeni na podlozi MS/2 sa 0,3 mg/l IAA. Na podlogama sa NAA, dužina korena bila je manja usled formiranja kalusa. Ožiljavanje je praćeno pojavom kalusa i kod *Mentha arvensis* tokom gajenja na podlogama sa NAA (Maity i sar., 2011). Kod *Thymus satureioides* ožiljavanje na podlogama sa visokim koncentracijama NAA i IAA, bilo je praćeno kalusiranjem (Nordine i sar., 2013 a). Po dodavanju egzogenih auksina dolazi do formiranja kalusa u bazi pupoljaka, ukoliko je

visok nivo endogenih auksina (Juliani Jr i sar., 1999). Pojava fenotipskih abnormalnosti u kulturi *in vitro*, obično ukazuje na suboptimalne uslove mikrosredine (Musarurwa i sar., 2010).

Dužina korena izdanaka *M. croatica* gajenih na podlozi sa IBA manja je od dužine korena kontrolnih izdanaka, ali razlika nije statistički značajna. Suprotno od *Micromeria*, kod *Pogestemon cablin* (Kumaraswamy i Anuradha 2010) koren je bio duži na podlogama MS/2 sa NAA nego na podlogama MS/2 sa IAA, dok je kod *Lavandula angustifolia* (Al-Bakhit i sar., 2007) i *Satureja khuzistanica* (Ramak i sar., 2011) koren bio duži u prisustvu IBA.

Kod obe vrste *Micromeria* prosečno najveća dužina korena ostvarena je na istim podlogama na kojima je ostvaren i najveći procenat ožiljenih izdanaka. Slično je zabeleženo i kod *Mentha viridis* kod koje su maksimalno ožiljavanje i maksimalna dužina korena postignuti na podlozi MS/2 sa 1,5 mg/l IAA (Rahman i sar., 2013). Pri istim koncentracijama različitih auksina, kod obe vrste *Micromeria* dužina korena bila je najveća na podlozi MS/2 sa IAA a najmanja na podlozi MS/2 sa NAA. Razlike u dužini korena su male i nisu statistički značajne kod obe vrste *Micromeria*, posmatrano na nivou istog tipa auksina (NAA ili IBA) različitih koncentracija.

Egzogeno primenjeni auksini doprinose ožiljavanju delujući različitim mehanizmima na homeostasis endogenih fitohormona. Oni mogu povećati količinu slobodnih endogenih auksina, mogu sinergistički modifikovati aktivnost ili sintezu endogenih auksina, ili povećati senzitivnost biljaka na auksin, doprinoseći ožiljavanju (Hartmann i sar., 2002).

Biljke koje rastu u kulturi *in vitro* imaju sitnije biljne organe, listovi su im tanki, mekani, nežni sa limitiranom fotosintetskom aktivnošću. Kutikula je slabo razvijena, palisadne ćelije su manje i sitnije, intercelulari u mezofilu su brojni i veći, a stome ne funkcionišu uobičajeno. Korenovi imaju malo ili nimalo korenskih dlačica i smanjen je transfer vode od korenova do izdanaka (Hazarika, 2003). Zbog izmenjenih anatomskih i fizioloških odlika, biljke koje su rasle u uslovima *in vitro*, zahtevaju postepeno privikavanje na *ex vitro* uslove. Po premeštanju u supstrat, u uslove manje vlažnosti vazduha, otvorene stome i slabo razvijena kutikula dovode do velikih gubitaka vode transpiracijom. Vodni stres je najintenzivniji u prvim časovima aklimatizacije i uspostavljanje mehanizma za zatvaranje stoma je ključno.

Aklimatizacija biljaka je proces koji zahteva da se poznaju uslovi u kojima je optimalno razviće date vrste kao i tolerantnost na izmenjene sredinske uslove. Biljke koje su se formirale u kulturi *in vitro* veoma su osetljive na promene temperature i vlažnosti, tako da i čak i male promene mogu dovesti do oštećenja biljaka i njihove smrti. Važno je da se u novoj sredini gubitak vode biljaka svede na minimum. Zbog toga se biljke gradacijski izlažu *ex vitro* uslovima.

U procesu aklimatizacije biljke obe vrste *Micromeria* bile su potpuno otkrivene nakon 4. nedelje. Da bi se dobio što veći broj zdravih biljaka, koraci aklimatizacije se prilagođavaju svakoj vrsti, pa se ne može govoriti o univerzalnosti procesa. U procesu aklimatizacije, biljke *Ocimum basilicum* su postepeno navikavane na izmenjene sredinske uslove prve dve nedelje aklimatizacije, a nakon 4 nedelje, trajno je sklonjen polietilenski poklopac i aklimatizovano je oko 90% biljaka (Siddique i Anis, 2008). Biljke *Orthosiphon aristatus* tokom tri nedelje su postepeno navikavane na uslove smanjene vlažnosti sredine, gradacijskim otkrivanjem (Jayakumar S., Ramalingam R. 2013), kao i biljke *Ocimum kilimandscharicum* od kojih je 81,13% biljaka aklimatizovano (Saha i sar., 2010).

Uspeh aklimatizacije zavisi od formiranih korenova u fazi ožiljavanja. Pošto je preživljavanje biljaka tokom aklimatizacije nezavisno od tipa i koncentracije auksina koji se koriste za ožiljavanje (Mišić i sar., 2006), na aklimatizaciju su postavljeni izdanci *Micromeria* koji su bili ožiljeni na podlogama sa različitom vrstom i koncentracijom auksina. Ožiljeni izdanci koji su formirali kalus nisu bili posađeni u zemlju.

U prvoj nedelji aklimatizacije stopa fotosinteze opada, a zatim raste. Takođe se smanjuje nivo fotosintetskih pigmenata u listovima koji su formirani u uslovima *in vitro* (Siddique i Anis, 2008). Listovi koji su razvijeni tokom aklimatizacije fotosintetski su superiorni u odnosu na listove razvijene *in vitro* (Carvalho i sar., 2001).

Aklimatizacija *M. pulegium* je bila uspešnija od aklimatizacije *M. croatica*. Tokom aklimatizacije, biljke obe vrste *Micromeria* poprimile su nove morfo-anatomske karakteristike što je doprinelo da se uspostave normalan vodni režim i autotrofni režim. Time su se stekli uslovi za rast i razviće u *ex vitro* uslovima. Listovi su postali deblji sa većom površinom i biljke su poprimile izgled biljaka iz prirode. Aklimatizovane biljke su bile bez morfoloških abnormalnosti.

5.2. MIKROMORFOLOŠKA I HISTOCITOLOŠKA ANALIZA TRIHOMA LISTOVA VRSTA *Micromeria*

Mikromorfolološkom analizom trihoma listova *M. pulegium* i *M. croatica* koje su gajene u uslovima *in vitro* potvrđeno je prisustvo neglandularnih i dva tipa glandularnih trihoma, varijabilne veličine i distribucije. Gustina trihoma je pod ontogenetskom kontrolom i prati razviće listova (Maffei i sar., 1989).

Neglandularne trihome (atenuatne) po Payneovoj terminologiji dlaka mogu biti jednoćelijske ili višećelijske, negranate, uniseriatne i različite po dužini (Payne, 1978). Neglandularne trihome se odlikuju bradavičastom površinom, usled prisustva kutikularnih mikropapila. Takve nežlezdane trihome primećene su i kod drugih vrsta *Micromeria*. Prisutne su kod *M. longipedunculata* (Kremer i sar., 2014b), *M. fruticosa* (Druce) (Werker i sar., 1985), *M. croatica* (Kremer i sar., 2012b), *M. juliana*, *M. kernerii* (Kremer i sar., 2014a), *M. pseudocroatica* (Kremer i sar., 2012a), *M. tymifolia* (Marin i sar., 2013) i *M. biflora* (Al Watban, 2004). Kod *M. tymifolia* distribucija neglandularnih trihoma je gusta sa obe strane lista.

U grupi glandularnih trihoma *M. pulegium* i *M. croatica* izdvajaju se peltatne i dva tipa kapitatnih. Peltatne trihome obeju vrsta slično izgledaju. Sastoje se od od jedne bazalne ćelije, kratke jednoćelijske drške i višećelijske glave iznad koje se kod zrelih trihoma nalazi veliki subkutikularni prostor za skladištenje sekretornih produkata. Ovakav tip peltatnih trihoma čest je kod vrsta familije Lamiaceae. Broj sekretornih ćelija glave je različit. Peltatne trihome *M. pulegium* gajene *in vitro* imaju osam sekretornih ćelija glave. Kod *M. tymifolia* ima ih dvanaest, kod *M. croatica* šesnaest, a kod *M. fruticosa* osamnaest (Werker i sar., 1985). Peltatne trihome listova biljaka gajenih *in vitro* nalaze se sa obe strane lista kod *M. pulegium* i samo na abaksijalnoj strani lista kod *M. croatica*. Kod *M. tymifolia* peltatne trihome su zastupljene sa obe strane lista, kod *M. longipedunculata* na abaksijalnoj strani lista, spoljnoj strani čašice i na stabljici. Kod *M. croatica* uvek su prisutne na naličju lista, čašici i na usni krunice, dok ih nema na licu lista, a ponekad ih nema ni na stabljici. Kod *M. kernerii* i *M. juliana* su na licu i naličju lista, čašici i stabljici.

Kod *M. pulegium* i *M. croatica* koje su gajene u uslovima *in vitro* izdvajaju se dva tipa kapitatnih trihoma. Tip I ima jednu bazalnu ćeliju, jednu kratku ćeliju drške i elipsoidnu jednoćelijsku glavu pognutu ka epidermalnoj površini. Tip II se sastoji od

jedne ćelije baze, jedne izdužene ćelije drške i globularne ćelije glave iznad koje se kod zrelih trihoma nalazi mali subkutikularni prostor za akumulaciju sekretornih produkata. Kod *M. pulegium* kapitatna trihoma tip II se odlikuje morfološkom raznovrsnošću, i može podsećati na digitiformne trihome koje se inače nalaze kod *M. tymifolia*.

Kapitatna trihoma tip I prisutna je i kod *M. longipedunculata* (Kremer i sar., 2014b), *M. croatica* (Kremer i sar., 2012b), *M. juliana* i *M. kernerii* (Kremer i sar., 2014a), *M. pseudocroatica* (Kremer i sar., 2012a). Kao i kod *Micromeria* gajenih u kulturi *in vitro* ove trihome ne stoje uspravno već su orjentisane ka površini. Nalaze se sa obe strane lista, na čašici i stabljici kod *M. juliana* i *M. kernerii* (Kremer i sar., 2014a), *M. tymifolia* (Marin, 2013). Kod *M. croatica* nalaze se na naličju lista, stabljici i rasute su po čašici, kod *M. longipedunculata* su sa obe strane lista i brakteola, sa obe strane čašice i na stabljici. Kod nabrojanih vrsta kapitatne trihome tip II su uspravne i izgrađene od jedne bazalne epidermalne ćelije, drške od dve do tri ćelije i manje jednoćelijske okrugle glave iznad koje je subkutikularni prostor. Kapitatna trihoma tip I sem kod *Micromeria* nađena je kod malog broja vrsta Lamiaceae kao što su *Satureja thymbra*, *Majorana syriaca* i *Thymus capitatus* (Werker i sar., 1985). Za razliku od prvog tipa, drugi tip kapitarnih trihoma je rasprostranjen kod mnogih vrsta familije Lamiaceae.

Kod *M. tymifolia* izdvajaju se osim navedenih i digitiformne trihome (Marin, 2013). Kapitarni trihome su brojniji od peltatnih i digitiformnih sa obe strane lista.

Malo je podataka koji opisuju trihome na organima biljaka gajenih u kulturi *in vitro*. Trihome su često prve strukture koje se mogu uočiti tokom diferencijacije u kulturi tkiva (Wagner, 1991). Zuzarte i saradnici (2010) navode da su svi tipovi trihoma koji postoje kod biljaka *Lavandula pedunculata* u prirodi, prisutni i kod biljaka *in vitro* i da među njima nema razlike u prirodi etarskih ulja koja proizvode. Kod nekih vrsta koje su gajene u kulturi *in vitro*, regulatori rasta prisutni u hranljivoj podlozi mogu uticati na gustinu trihoma. Veću gustinu glandularnih trihoma kao i veći prinos etarskih ulja Fraternale (2003) beleži u prisustvu BA 0,1 mg/L kod biljaka *Thymus mastichina* koje su gajene u kulturi *in vitro*. Kod *Lavandula dentata* prisustvo iste koncentracije BA u hranljivoj podlozi ima suprotan efekat i na površini listova je formiran manji broj trihoma koji su bili u sekretornoj fazi, što se dovodi u vezu sa odlaganjem senescencije listova i time diferencijacije sekretornih trihoma (Sudria i sar., 2004). Biljke različitih

vrsta lavande gajene u kulturi *in vitro* pokazuju pozitivnu korelaciju između akumulacije ulja i procenta žlezdanih trihoma u sekretornoj fazi. Sadržaj etarskih ulja *L. dentata* koja je gajena u kulturi *in vitro*, više zavisi od sekretornog stadijuma glandularnih trihoma nego od njihove gustine. *L. dentata* gajena u prisustvu BA, imala je i pored smanjenog broja trihoma, veću količinu ulja, jer je većina trihoma bila u sekretornoj fazi (Sudria i sar., 1999).

Mikroskopska analiza glandularnih trihoma *M. pulegium* i *M. croatica* gajenih *in vitro*, potvrđuje prisustvo etarskih ulja u sekretornim komponentama. Sekretorne kapi osim u subkutikularnom prostoru glandularnih trihoma, nalaze se i u sekretornoj ćeliji i ćeliji drške. Sva tri tipa glandularnih trihoma učestvuju u produkciji etarskih ulja. Premda se nalazi i u kapitatnim trihomama, peltatne trihome produkuju najviše ulja kod Lamiaceae (Huang i sar., 2008). Maffei (1989) navodi da su upravo peltatne trihome koje su veće od drugih, najviše odgovorne za produkciju etarskih ulja. Smatra se da dijametar i veličina trihome nisu u korelaciji sa kapacitetom akumulacije produkata (Dell i Comb, 1977). U mnogim kapitatnim trihomama ćelije drške sadrže sekretorne produkte, ali zadebljala kutikula predstavlja barijeru koja sprečava da se one sekretuju kao deo etarskih ulja (Fahn 1988, Huang i sar., 2008). Ultrastrukturnom analizom sekretorne faze ćelije glave žlezdanih trihoma *M. tymifolia*, primećeni su u gustom citoplazmi plastidi sa masnim kapima, mitohondrije i proliferacija granularnog endoplazmatičnog retikuluma. Histohemijske analize ukazuju na prisustvo komponenata (polisaharida, lipida, terpena i fenola), koje zbog svog biološkog efekta mogu biti korisne u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Marin i sar., 2013).

Morfologija, tip, distribucija, učestalost i kompozicija sekretornih komponenti žlezdanih trihoma veoma variraju među vrstama i koriste se kao diskriminativni karakteri na subfamilijarnom nivou u sistematici familije Lamiaceae (Ascensao i sar., 1995; Xiang i sar., 2010).

5.3. HEMIJSKI SASTAV ETARSKIH ULJA *Micromeria*

Za analizu etarskih ulja vrsta roda *Micromeria* korišćen je osušen biljni materijal. Sušenjem je smanjen sadržaj vlage u biljnom materijalu, što omogućava njegovo dugotrajnije skladištenje. Ranija istraživanja su pokazala da način sušenja ima značajan efekat na sadržaj i sastav etarskih ulja (Asekun i sar, 2006; Ahmadi i sar, 2008). Sunčeva svetlost i temperatura direktno utiču na sadržaj mentona, pulegona i piperitona. Porast temperature i duže izlaganje sunčevoj svetlosti tokom sušenja biljnog materijala *Micromeria barbata* rezultira velikim gubicima navedenih komponenti (Alwan i sar., 2014). Kako bi se izbegao uticaj metoda sušenja na prinos i sastav ulja, biljni materijal iz prirode i dobijen gajenjem u kulturi, je sušen na isti način, bez direktnog izlaganja svetlosti, na temperaturi ~ 25°C.

Sav biljni materijal sakupljen je u vegetativnoj fazi kako bi se izbegao uticaj faze ontogenetskog razvića na sadržaj i kompoziciju etarskih ulja. Ontogenetsko razviće listova utiče na metabolizam etarskih ulja. Postoji tesna veza između biosinteze ulja i razvoja biljnih tkiva jer se biohemijske reakcije smenjuju u skladu sa dinamikom razvića (Sangwan i sar., 2001).

Gajenjem u kulturi *in vitro* eliminisan je uticaj fotoperioda na biosintezu etarskih ulja, jer su sve biljne kulture rasle u uslovima istog fotoperioda. Poznato je da se na dugom danu smanjuje nivo mentofurana, pulegona, metil acetata i limonena a raste sadržaj mentona, mentola i neo-mentol acetata (Clark i Menary 1980).

Efekat fitohormona na produkciju ulja u sistemima *in vitro* kulture je veoma različit, od promena na nivou prinosa do promena na nivou sastava ulja. Fitohormoni utiču na rastenje i razviće biljaka tako što utiču na gensku regulaciju, fiziološke i biohemijske procese, ali i na produkciju sekundarnih metabolita (Shukla i Farooqi, 1990; Affonso i sar., 2009; Baskaran i sar., 2012).

Dosadašnja istraživanja uticaja fitohormona na razviće biljaka različitih vrsta u kulturi *in vitro* i biosintezu etarskih ulja ukazuju da oni zavise od koncentracije i vrste fitohormona na različite načine. Tokom tretmana fitohormonima kod različitih Lamiaceae (Santos-Gomes i sar., 2002; Fraternali i sar., 2003; Sudria i sar., 1999) primećeno je da vrsta i koncentracija fitohormona mogu značajno da utiču na akumulaciju etarskih ulja pri čemu citokinini više doprinose produkciji ulja od auksina. Biljke tretirane fitohormonima najčešće imaju izmenjen kvantitativni sastav

dominantnih komponenti u ulju, dok se razlike u kvalitativnom sastavu retke, u poređenju sa biljkama iz prirode. Među hormonima koji stimulišu rastenje, povećavaju površinu listova, grananje i sadržaj etarskih ulja, posebno se izdvaja GA₃ (Sanwan i sar., 2001)..

Fitohormoni u hranljivoj podlozi utiču na formiranje biomase kao i na prinos i kvalitet ulja. Formiranje veće biomase, za vreme vegetativnog razvića, pre svega listova, od značaja je za veći prinos ulja aromatičnih biljaka (Sangwan i sar., 2001; Prins i sar., 2010; Santoro i sar., 2013). Najveći prinos biomase *M. pulegium* ostvaren je na hranljivoj podlozi MS sa 10 µM BA. Naši rezultati pokazuju da produkcija veće biomase *M. pulegium* nije praćena većim prinosom ulja. Prisustvo BA u hranljivoj podlozi dovelo je do smanjene produkcije ulja u izdancima. Najveći prinos biomase *M. croatica* bio je na hranljivoj podlozi MS sa 0,3 µM kinetina. Za razliku od BA prisustvo kinetina imalo je stimulativni efekat na produkciju etarskih ulja. Količina etarskog ulja u izdancima gajenim na podlozi sa kinetinom bila je dvostruko veća u nego u izdancima biljaka iz prirode.

Zajedničko za etarska ulja vrsta koje smo analizirali je da dominiraju monoterpeni, pre svega oksidovani monoterpeni i njihov sadržaj je veći kod *M. pulegium* nego kod *M. croatica*. Mala je razlika u količini između monoterpena i seskviterpena u ulju biljaka *M. croatica* iz prirode. Takođe je mala razlika između količine oksidovanih monoterpena i seskviterpenskih ugljovodonika u ulju biljaka *M. croatica* iz prirode. Razlike su uzraženije u uljima *in vitro* gajenih izdanaka.

Dominantne komponente u svim etarskim uljima *M. pulegium* bez obzira na poreklo biljnog materijala bili su pulegon i menton. Prisustvo BA u hranljivoj podlozi dovelo je do smanjenja sadržaja pulegona i mentona u ulju *in vitro* gajenih biljaka u odnosu na ulja biljaka iz prirode. Smanjen je sadržaj oksidovanih monoterpena koji su dominantni a povećan sadržaj monoterpenskih ugljovodonika koji su inače manja frakcija u uljima. Izdanci koji su gajeni *in vitro* imaju u uljima povećan sadržaj seskviterpena, prevashodno ugljovodonika, naročito u prisustvu BA.

Fizičko-hemijski uslovi gajenja u kulturi *in vitro* utiču na prirodu etarskih ulja *M. croatica*. Sadržaj komponenti koje dominiraju u uljima biljaka iz prirode, borneola α -kadinena i β -vetivenena, višestruko se smanjuje u uljima izdanaka gajenih *in vitro*. Nasuprot tome sadržaj geraniala se povećava sa 2,19% koliko ga ima u uljima biljaka iz

prirode na 33,53% u ulju izdanaka gajenih *in vitro* u prisustvu kinetina. Takođe se povećava i sadržaj *cis-p*-Menta-1(7),8-dien-2-ol sa 1,83% koliko ga ima u uljima biljaka iz prirode na 23,69% u ulju izdanaka gajenih *in vitro* u prisustvu kinetina. Kod izdanaka *M. croatica* gajenih u kulturi *in vitro* primećena je tendencija povećanja sadržaja monoterpena u uljima a smanjenje sadržaja seskviterpena, pa se može reći da uslovi u kulturi *in vitro* na različite načine menjaju sastav etarskih ulja.

Prisustvo BA u hranljivoj podlozi nije uticalo na sastav ulja *M. pulegium*. Isti rezultat je postignut i kod *Salvia stenophylla* (Hannibal i sar., 2010), *Lavandula pedunculata* (Zuzarte 2010) i *L. viridis* (Nogueira and Romano 2002). Kada se uporede etarska ulja biljaka *L. viridis* koje su rasle u prirodi sa uljima dobijenim od mikropropagiranih biljaka i pupoljaka gajenih u kulturi *in vitro*, primećeno je da su glavne komponente svuda iste i nema značajnih varijacija u sastavu. Sličnost hemijskog sastava etarskih ulja *in vitro* i *ex vitro* biljaka ukazuje da metoda kulture biljnih tkiva *in vitro* nema značajan uticaj na biosintezu ulja datih vrsta.

Drugačiji rezultati dobijeni su kod *Thymus mastichina*, tretman sa BA ne dovodi do kvalitativnih promena u sastavu ulja, ali je relativni procenat glavnih komponenti veći oko dva puta (Fraternali i sar., 2003). Santoro (2013) je ispitivao uticaj citokinina na produkciju sekundarnih metabolita *Mentha piperita*. Tretman sa BA menja relativan procenat etarskih ulja, pa je tako relativan sadržaj glavne komponente pulegona, kao i mentona i mentola oko dva puta veći nego kod kontrolnih biljaka.

Primena regulatora rastenja na zeljaste biljke bogate terpenima doprinosi njihovoj biomasi povećavajući istovremeno biosintezu etarskih ulja. Citokinin utiče na tok biosintetskog puta ili na konkretne korake u metabolizmu monoterpena. Monoterpenska frakcija ulja izdanaka iz kulture *in vitro* ima različitu relativnu količinu ugljovodoničnih i oksidovanih komponenata u odnosu na roditeljsku biljku i mikropropagirane biljke (Nogueira i Romano, 2002).

Arikat i saradnici (2004) su upoređivali ulja mikropropagiranih biljaka *Salvia fruticosa* i pupoljaka biljaka iz staklenika. Primećeno je da mikropropagirane biljke imaju veći sadržaj ulja. Uticaj kinetina na prinos biomase i veći sadržaj etarskih ulja u odnosu na prirodne populacije, zabeležen kod *M. croatica*, primećen je kod različitih vrsta familije Lamiaceae. Najveći prinos biomase izdanaka *Salvia officinalis* gajenih u kulturi *in vitro* kao i najveća akumulacija etarskih ulja postignuta je po dodavanju 2,0

mg/L kinetina (Santos-Gomes i sar., 2002). Primena kinetina stimuliše razvoj zelene mase i sadržaj ulja pitome nane (Zlatev i sar. 1978). Folijarna primena kinetina povećava prinos ulja kod *Mentha piperita* i *M. spicata* (El-Keltawi and Croteau 1987).

Dominantne komponente u ulju *M. pulegium*, pulegon i menton, dominiraju i u uljima drugih vrsta roda *Micromeria* predstavnika sekcije *Pseudomelissa* (Tab. 1). Geranial koji dominira u uljima *M. croatica* koje su gajene u uslovima *in vitro* nije dominantan u ulju biljaka *M. croatica* koje su poreklom iz različitih prirodnih populacija (Slavkovska i sar., 2005; Kremer i sar., 2012), pa se može sa sigurnošću reći da je njegova biosinteza stimulirana uslovima koji vladaju u kulturi *in vitro*. Geranial dominira u ulju manjeg broja vrsta *Micromeria*. Njegovo prisustvo kao dominantne komponente zabeleženo je kod *M. biflora* (Mallavarapu i sar., 1997) i *M. varia* subsp. *thymoides* var. *thymoides* (Pedro i sar., 2006).

5.4. HEMIJSKA ANALIZA EKSTRAKATA *M. pulegium* i *M. croatica*

Za pripremanje ekstrakata korišćeni su različiti rastvarači kako bi se odvojili sekundarni metaboliti biljaka prema polarnosti, i radi pojednostavljivanja analize, koja bi bez tog koraka bila gotovo nemoguća. Na osnovu prisustva identifikovanih jedinjenja u različitim ekstraktima analiziranih vrsta, može se uočiti da su hemijski sastavi biljaka *Micromeria* iz prirode i izdanaka gajenih *in vitro* donekle različiti.

Kod *M. pulegium* 42,22 % jedinjenja je zajedničko za biljni materijal poreklom iz prirode i kulture *in vitro*, dok je u uzorcima *M. croatica* različitog porekla 67,65% zajedničkih jedinjenja. Može se zaključiti da je tokom gajenja u kulturi *in vitro*, hemijski sastav *M. croatica* više očuvan i da na *M. pulegium* u većoj meri deluju faktori sredine koji se u kulturi *in vitro* bitno razlikuju od prirodnih sredinskih uslova. Razlike u hemijskom sastavu svakako su posledica izmenjenih uslova sredine. Koji mehanizmi posreduju u takvom odgovoru nije rasvetljeno, što je i razumljivo jer metabolički putevi većine jedinjenja nisu poznati. Neka jedinjenja koja su prisutna u vegetativnim organima biljaka koje su rasle na prirodnom staništu nisu se sintetisala u uslovima *in vitro*, ili se njihov metabolizam isuviše brzo odvija da bi bila detektovana. Pošto su se na eksplantatima u uslovima *in vitro* razvijali formirajući aksilarne pupoljke, može se pretpostaviti da je reč o jedinjenjima koja nemaju veliku ulogu u razviću vegetativnih

organa. Imajući u vidu da se u biljkama tokom gajenja *in vitro* sintetišu jedinjenja kojih nema u biljkama iz prirode, moguće je da se u izmenjenim sredinskim uslovima dolazi do metaboličkog šifra, pa se aktiviraju metabolički putevi za biosintezu alternativnih jedinjenja koja će zameniti ulogu jedinjenja iz prirode.

Upoređujući hemijski sastav na nivou vrsta može se primetiti da je od ukuno 53 jedinjenja koliko ih je detektovano, kod *M. pulegium* zastupljeno 35,85% jedinjenja kojih nema kod *M. croatica*, dok je 15,09% jedinjenja nađeno samo kod *M. croatica*. Kada se uporede hemijski sastavi *M. pulegium* i *M. croatica* iz prirode, zapaža se da je 30,18% jedinjenja od ukupno 53 zastupljeno kod obe vrste. Taj udeo zajedničkih jedinjenja je manji i iznosi 26,41% kad se međusobno upoređuju izdanci *M. pulegium* i *M. croatica* gajeni *in vitro*. Posmatrajući grupu zajedničkih jedinjenja detektovanih u materijalu iz prirode, može se zapaziti da su u *in vitro* uslovima kod obe vrste prisutna 7 jedinjenja (teukrin G, diosmetin-7-O-glikozid, apigenin, diosmetin-6-C-glukozid, galna kiselina monohidrat, $[C_{18}H_{12}O_3-Na]^+$ i luteolin-7-O-rutinozid).

Registrovana je sličnost hemijskog sastava na nivou iste vrste, bez obzira na poreklo materijala (priroda i *in vitro* gajenje). Sa druge strane, primećeno je da se hemijski sastav upoređivanih vrsta razlikuje bez obzira na istovetnost njihovog porekla. Takav ishod je i očekivan, jer se radi o vrstama koje se, iako pripadaju istom rodu, svrstavaju u dve različite sekcije. Na taj način je dokazano da je hemijski sastav izdanaka gajenih u uslovima *in vitro*, ostao relativno očuvan kod obe vrste.

5.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA *Micromeria*

Antioksidativna svojstva biljaka uglavnom potiču od njihovih sekundarnih metabolita. Među njima zapaženu ulogu imaju polifenoli. Brojna fenolna jedinjenja sa izraženom antioksidativnom i antibakterijskom aktivnošću identifikovana su u mnogim biljkama, a naročito u vrstama Lamiaceae (Kandasamy i sar., 2013; Ozkan i sar., 2003). Među njima zapaženo mesto imaju i vrste roda *Micromeria* (Vladimir-Knežević i sar., 2011).

Analizirana je ukupna antioksidativna aktivnost ekstrakata *Micromeria* a ne pojedinačnih jedinjenja, potencijalnih antioksidanasa, pošto zajedno doprinose antioksidativnom kapacitetu delujući aditivno, sinergistički ili antagonistički.

Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata izdanaka *Micromeria* sakupljenih u prirodi i tokom gajenja u uslovima *in vitro* određena je primenom različitih metoda. Prema Cuvelier-u i saradnicima (1996) kvalitet ekstrakata i njihova antioksidativna svojstva zavise od kvaliteta originalnih biljaka, vremena uzorkovanja i skladištenja. Za određivanje antioksidativne aktivnosti korišćeni su zdravi izdanci u ranoj vegetativnoj fazi koji su sakupljeni u prirodi i gajenjem u uslovima *in vitro*, i koji su potom osušeni i čuvani na isti način do upotrebe. Za spremanje ekstrakata korišćen je metanol. Metanol je efikasan rastvarač za ekstrakciju fenolnih jedinjenja. Polarni rastvarači ekstrahuju više antioksidanasa iz biljnog materijala nego nepolarni i manje polarni rastvarači (Dobravalskyte i sar., 2012, Grzegorzczuk i sar., 2007). Većina vrsta koje pripadaju rodovima *Calamintha* i *Micromeria* imaju bolju antioksidativnu aktivnost na nivou polarnih ekstrakata nego drugih ekstrakata ili ulja (Formisano i sar., 2014). Imajući u vidu da tokom gajenja u uslovima *in vitro*, regulatori rastenja dodati u hranljivu podlogu mogu inhibirati aktivnost nekih enzima koji su uključeni u biosintetske puteve sekundarnih metabolita (Rothe i sar., 2003), za procenu antioksidativne aktivnosti pupoljaka *Micromeria* gajenih u uslovima *in vitro*, korišćeni su samo pupoljci kultivisani u odsustvu regulatora rastenja.

Zbog jednostavnog postupka izvođenja i visoke reproduktivnosti, DPPH metoda se često koristi za merenje antioksidativne aktivnosti. Vrednosti antioksidativnog potencijala metanolnih ekstrakata *Micromeria* određene DPPH metodom su u intervalu od 2,88 do 4,64%, što ih svrstava u grupu jakih antioksidanasa s obzirom da pod istim uslovima referentni standard BHT, u istoj koncentraciji, ima aktivnost 3,18%. Male su razlike između vrsta kao i na nivou vrste između biljnih uzoraka iz prirode i kulture *in vitro*. Smanjenje apsorpcije DPPH u prisustvu metanolnih ekstrakata izraženije je kod *M. croatica*.

ABTS metoda se široko primenjuje za procenu antioksidativne aktivnosti. Ovom metodom se za kratko vreme može analizirati veliki broj uzoraka i manji je broj interferirajućih jedinjenja tokom merenja (Surveswaran i sar., 2007). Antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakata koje su procenjene ABTS testom bile su u opsegu 0,57-1,05 mg troloks ekvivalenata/ml rastvora. Bolje vrednosti su dobijene za ekstrakte *in vitro* gajenih izdanaka. Uslovi u kulturi *in vitro* kod *M. croatica* za 268,37% više stimulišu antioksidativnu aktivnost nego kod *M. pulegium*.

Sadržaj flavonoida u biljnim ekstraktima smanjuje se kod obe vrste tokom gajenja u kulturi *in vitro*.

Kod *M. pulegium* i *M. croatica* ukupna redukciona moć određena za izdanke koje su se razvijali i rasli u uslovima *in vitro* ima veću vrednost u odnosu na biljke iz prirode. To se može objasniti povećanim sadržajem ukupnih fenola (za 55,68%, 136% ponaaosob) u izdancima biljaka gajenih *in vitro*. Povećan sadržaj ukupnih fenola pa samim tim i porast ukupne redukcionne moći izdanaka gajenih u izmenjenim uslovima u kulturi *in vitro*, više dolaze do izražaja kod *M. croatica* nego *M. pulegium*. Za različite vrste *Micromeria* potvrđeno je da antioksidativnoj aktivnosti doprinosi ukupan sadržaj fenola (Vladimir-Knežević i sar., 2011). Korelacija između antioksidativne aktivnosti ekstrakata i sadržaja fenola potvrđena je i kod drugih vrsta Lamiaceae (Tosun i sar., 2009; Lopez, 2007).

Upoređujući međusobno metanolne ekstrakte *M. pulegium* i *M. croatica* očigledno je antioksidativna aktivnost ekstrakata *M. croatica* bolja, bez obzira na poreklo biljnog materijala. Vladimir-Knežević i sar (2011) su upoređivali antioksidativnu aktivnost etanolnih ekstrakata *M. croatica*, *M. juliana* i *M. thymifolia*. Među njima *M. croatica* je imala najbolju antioksidativnu aktivnost. Metanolni ekstrakt *M. croatica* ima antioksidativnu i pro-oksidativnu aktivnost. Štiti molekule DNA i lipida od oksidativnih oštećenja. U niskim koncentracijama ima antioksidantno delovanje na proteine a u visokim pro-oksidativno. U visokim koncentracijama, metanolni ekstrakt ima citotoksično delovanje na HEp2 ćelije i dovodi do nastanka ROS vrsta (Šamec i sar., 2015). Antioksidativne osobine svojstvene su i drugim vrstama *Micromeria*. Acetonski ekstrakt *Micromeria cilicica* ispoljava dobru antioksidativnu aktivnost (Oeztuerk i sar., 2011). Metanolni ekstrakt *Micromeria fruticosa* ssp. *serpyllifolia* poreklom iz Turske ima značajnu antioksidativnu aktivnost merenu DPPH metodom (Gulluce i sar., 2004). Metanolni ekstrakt *M. myrtifolia* ima dobru DPPH aktivnost kao i redukcionu moć, dok etarska ulja i heksanski ekstrakt ne pokazuju aktivnost u hvatanju slobodnih radikala ali imaju redukcionni potencijal. Takođe metanolni ekstrakt *Micromeria myrtifolia* za razliku od hloroformnog i heksanskog ima visok sadržaj polifenola (Formisano i sar., 2014).

Dobra antioksidativna aktivnost uslovljena sadržajem polifenola zabeležena je i kod endemičnih vrsta drugih familija *Rubiaceae* i *Myrtaceae* (Angaji i sar., 2012). Pošto

se endemične vrste ne mogu eksploatirati iz prirode, preporučljivo je njihovo gajenje u uslovima *in vitro*.

Na akumulaciju sekundarnih metabolita u biljkama u velikoj meri utiču sredinski uslovi, što je i razumljivo jer upravo oni posreduju u odgovoru biljke na izmenjene sredinske uslove. Fizičko-hemijski sredinski faktori koji vladaju u uslovima *in vitro* su u izvesnoj meri stresni faktori koji doprinose većoj produkciji antioksidativnih komponenti. Akumulacija sekundarnih metabolita varira i u odnosu na biljni organ. Količina ukupnih fenola u biljkama *M. croatica* veća je u listovima i cvetovima nego u stabljici. U stabljikama je sadržaj ukupnih flavonoida oko dva puta manji nego u listovima ili cvetovima. Cvetovi i listovi *M. croatica* imaju sličnu antioksidativnu aktivnost, dok je vrednost stabljike znatno manja. Merenje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom rezultira većim vrednostima u listovima nego u stabljici. Kada je određena antioksidativna vrednost ABTS metodom za stabljike *M. croatica* koje su sakupljene sa različitih lokaliteta dobijene vrednosti se nisu mnogo razlikovale (Šamec 2013).

Obe vrste *Micromeria* imaju bolju antioksidativnu aktivnost kada su gajene u uslovima *in vitro*. Tokom gajenja u kulturi *in vitro* antioksidativni potencijal izdanaka *M. pulegium* je očuvan (Tošić i sar., 2015). Ekstrakti dobijeni od kultura različitih organa *Salvia officinalis* imaju dobru ili čak bolju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa ekstraktima istih biljnih organa iz prirode (Grzegorzcyk i sar., 2007). Fenolna jedinjenja sa dobrom antioksidativnom aktivnošću prisutna su u kulturi izdanaka *Salvia officinalis* (Santos-Gomes i sar., 2002). U eksperimentima sa različitim sortama bosiljka primećeno je da kultura tkiva ili ćelija *in vitro* akumulira više sekundarnih metabolita nego donor biljka (Kiferle i sar., 2011; Bertoli i sar., 2013). Akumulacija ovih metabolita je često u posebnim ćelijama ili organima i njihova biosinteza je obično indikovana morfološkom diferencijacijom. Očekivano je da se u izdancima u uslovima kulture *in vitro* stvaraju isti metaboliti kao i u izdancima intaktne biljke (Alfermann i Petersen, 1995). Biljke dobijene mikropropagacijom kao i pupoljci gajeni u kulturi *in vitro* imaju dobar kapacitet za produkciju sekundarnih metabolita (Massot i sar., 2000). Sekundarni metaboliti sa visokim antioksidativnim potencijalom prisutni su različitim vrstama Lamiaceae koje su gajene metodom kulture *in vitro*: *Ocimum sanctum* (Hakkim i sar., 2007), *Lavandula viridis* (Costa i sar., 2013), *Ziziphora tenuior* (Dakah i sar.,

2013), *Z. canescens* (Dakah i sar., 2014). Biljke gajene u kulturi *in vitro* ne gube antioksidativni potencijal i mogu poslužiti kao alternativa za produkciju aktivnih metabolita.

Zahvaljujući antioksidativnoj aktivnosti vrste *Micromeria* bi mogle imati primenu u preventivnoj medicini i u prehrambenoj industriji.

5.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA VRSTA RODA *Micromeria*

Nekontrolisanom upotrebom antibiotika patogeni mikroorganizmi su vremenom postali rezistentni na mnoge. To je pobudilo veliko interesovanje za prirodne izvore antibakterijskih jedinjenja kao što su biljni ekstrakti i etarska ulja (Salehi i sar., 2007).

5.6.1. Antimikrobna aktivnost ekstrakata *M. pulegium* i *M. croatica*

U dostupnoj literaturi je pronađeno vrlo malo podataka o antimikronom delovanju ekstrakata nadzemnog dela biljnih vrsta roda *Micromeria*. Za vrstu *M. nervosa* je upoređivana aktivnost etanolnog i etil-acetatnog ekstrakta (koncentracije 200 mg/mL) sa aktivnošću timola i karvakrola koji su prisutni u vrstama roda *Micromeria* i koji su poznati antimikrobni agensi (Ali-Shtayeh i sar., 1997). Takođe, poređene su antimikrobne aktivnosti etarskog ulja (koje je bogato piperitonom i pulegonom) i metanolnog ekstrakta, dobijih iz nadzemnih delova biljne vrste *M. fruticulosa* ssp *serpyllifolia*, protiv patogenih bakterijskih i fungalnih sojeva, i ustanovljeno je da 300 µg/disku metanolnog ekstrakta nije delovao ni na jedan testiran soj (Gulluce at al., 2004). Sa druge strane, rezultati poređenja antimikrobnih aktivnosti ulja, heksanskog, etil-acetatnog ekstrakta biljne vrste *M. cilicica* i pulegona su, za većinu bakterijskih patogenih sojeva, pokazali iste zone inhibicije (Duru i sar., 2004). Daleko slabije delovanje je izmereno kod etanolnog ekstrakta biljne vrste *M. juliana* koji je od sedam ispitivanih sojeva delovao samo na *S. epidermidis* – zona inhibicije je bila 12 mm (Sarac and Ugur, 2007). Pretpostavlja se da su sekundarni metaboliti lipofilne prirode kojih ima u uljima ali ne i u ekstraktima, uzrok njihovog različitog antimikrobnog delovanja (Šamec, 2013). Osim za vrstu *M. nervosa* (Ali-Shtayeh i sar., 1997), za ostale vrste nisu navedene koncentracije testiranih ekstrakata, a u svim radovima

upotrebljavana je disk-difuziona metoda koja je neprecizna i nereproduktibilna i može se koristiti samo za preliminarni antimikrobni skrining.

Do sada je ispitana antimikrobna aktivnost metanolnog ekstrakta *M. croatica*, ispitana „agar well assay“ i „filter disk assay“ metodama protiv sojeva: *Staphylococcus aureus* 3048, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar typhimurium FP1 i *Bacillus subtilis* ATCC 6633, i dala je negativne rezultate (Šamec, 2013). Na žalost poređenje sa našim rezultatima nije moguće zbog činjenice da su korišćene metode koje imaju različitu osetljivost. Takođe je poznato da ekstrakti ove vrste (dietil eterski, etil acetatni i n-butanolski) u *in vitro* i u *in vivo* uslovima imaju dobru antioksidativnu aktivnost (Panovska i sar., 2010) što ih čini opravdanim za upotrebu u cilju poboljšanja opšteg zdravstvenog stanja.

U ovom radu su testirani metanolni ekstrakti *M. pulegium* i *M. croatica*, pripremljeni od nadzemnih biljnih delova uzetih iz prirode u vegetativnoj fazi razvika i od izdanaka gajenih tokom 4 nedelje u kulturi *in vitro* na MS podlozi bez fitohormona. Metanolni ekstrakti *M. pulegium* ispoljavaju slabu antimikrobnu aktivnost (Tošić i sar., 2015). Inhibitorne i baktericidne koncentracije ekstrakata *M. pulegium*, poreklom iz prirode i iz kulture su bile u rangu od 25,13 – 50,25 mg/mL i od 17,13 – 68,70 mg/mL (respektivno) protiv Gram (-) bakterije i od 12,57 – 50,25 mg/mL tj od 17,13 – 68,70 mg/mL za Gram (+) bakterije. Kod *M. croatica* inhibitorne i baktericidne koncentracije ekstrakata poreklom iz prirode i iz kulture su bile u rangu od 36,25 – 72,50 mg/mL; i 20,25 – 40,50 mg/mL (respektivno) protiv Gram (-) bakterije i od 90,60 – 72,50 mg/mL; 10,13 – 40,50 mg/mL za Gram (+) bakterije. Za 4 analizirana ekstrakta baktericidno delovanje ni u najvišoj testiranoj koncentraciji ne dolazi do izražaja za većinu testiranih bakterijskih sojeva. Najviše testirane koncentracije ekstrakta nisu imale baktericidno delovanje protiv sojeva *P. aeruginosa* (MBC>50,25 mg/mL i MBC>68,70 mg/mL, za ekstrakt *M. pulegium* dobijen iz prirode i iz *in vitro* kulture, kao i MBC>40,5 mg/mL za ekstrakt *M. croatica* dobijen od *in vitro* gajenih biljaka, *B. cereus* (MBC>50,25 mg/mL za ekstrakt *M. pulegium* dobijen iz *in vitro* kulture) i *E. coli* (MBC>40,50 mg/mL za ekstrakt *M. croatica* dobijen od *in vitro* gajenih izdanaka). U odnosu na obe vrste najrezistentniji je bio soj *P. aeruginosa* MIC/MBC=25,13/>50,25 mg/mL i 68,70/>68,70 mg/mL, za ekstrakt *M. pulegium* dobijen iz prirode i iz *in vitro* kulture, odnosno MIC/MBC=72,50/>72,50 mg/mL i 40,50/>40,50 mg/mL za ekstrakt *M. croatica*, ponaosob. Na ekstrakte *M. croatica* soj *E.coli* je takođe rezistentan. Među korišćenim sojevima najosetljiviji je *S. aureus* na koga su ekstrakti obe vrste *Micromeria* delovali u najnižim koncentracijama, sledećim redom: *M. pulegium*

(priroda) > *M. pulegium* (kultura *in vitro*) > *M. croatica* (kultura *in vitro*) > *M. croatica* (priroda).

Za sve testirane sojeve bakterija izuzev *B. cereus*, premda slabu, bolju antimikrobnu aktivnost ima *M. croatica* gajena u uslovima *in vitro* nego biljke *M. croatica* uzete sa prirodnih staništa. Izdanci *M. pulegium* gajeni u kulturi *in vitro* imaju bolje antinikrobno delovanje od biljaka iz prirode samo u odnosu na *B. cereus* i donekle *S. entitidis*. Postojanje antimikrobnog potencijala vrsta gajenih *in vitro* *M. pulegium* i *M. croatica* je od velikog značaja, jer je reč o prirodno ugroženim vrstama koje se ne mogu eksploatisati iz prirode. Na antibakterijsko delovanje ekstrakata obe vrste *Micromeria*, osetljivije su bile Gram-pozitivne bakterije. U brojnim istraživanjima pokazalo se da su Gram-pozitivne bakterije osetljivije od Gram-negativnih (Juliano i sar., 2000; Lambert i sar., 2001; Harpaz i sar., 2003; Hanamanthagouda i sar., 2010; Okoh i sar., 2010). Gram-negativne bakterije imaju oko peptidoglikanskog dela ćelijskog zida još jednu membranu, što znatno redukuje difuziju hidrofobnih komponenti kroz njihov lipopolisaharidni omotač (Ratledge and Wilkinson, 1988; Vaara, 1992).

Ekstrakti biljaka *M. pulegium* i *M. croatica* iz prirode i iz kulture *in vitro* nisu se značajno razlikovali u antimikrobnom delovanju. Nema značajnih razlika u antimikrobnoj aktivnosti ni između samih vrsta. Sumirajući rezultate, očigledno je da je antimikrobna aktivnost ekstrakata niska. Biljni ekstrakti koji imaju MIC vrednosti manju od 100 µg/mL smatraju se nedelotvornim (Cos i sar., 2006), pa dobijene vrednosti kod *Micromeria* nisu značajne sa aspekta antimikrobnog delovanja. Međutim, nikako ne treba zapostaviti vrste roda *Micromeria* kao potencijalni izvor antimikrobnih jedinjenja koja bi mogla biti identifikovana i izolovana iz različitih nadzemnih delova biljke. U vezi sa tim, kao i sa činjenicom da je njihova populacija u prirodi ograničena, veoma je važan podatak da nema značajne razlike u antimikrobnom delovanju ekstrakata biljaka koje su prikupljene u prirodi i odgajene u kulturi *in vitro*.

6. ZAKLJUČCI

- Na osnovu rezultata ove disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:
- Uspešno je indukovana *in vitro* organogeneza vrsta *M. pulegium* i *M. croatica* u kulturi segmenata stabla. Najveći broj pupoljaka formiran je na eksplantatima *M. pulegium* na podlozi sa 3 μ M BA. Najveći prinos biomase izdanaka *M. pulegium* postignut je na podlozi sa 10 μ M BA. Primarni eksplantati za uspostavljanje kulture *in vitro* *M. croatica* bili su segmenti stabla sa jednim nodusom, sa klijanaca dobijenih *in vitro*. Najveći broj pupoljaka po eksplantatu i najveći prinos biomase dobijeni su na podlozi sa 0,3 μ M kinetina.
- Koncentracija i tip hormona uticali su na ožiljavanje izdanaka. Ožiljavanje izdanaka *M. pulegium* bilo je najuspešnije na MS/2 hranljivoj podlozi sa 1 mg/L IAA. Ožiljavanje izdanaka *M. croatica* bilo je najuspešnije na MS/2 hranljivoj podlozi sa 0,3 mg/L IAA. Dobijene biljke *M. pulegium* i *M. croatica* uspešno su aklimatizovane.
- Efekat fitohormona na produkciju sekundarnih metabolita je različit. Fitohemijskom karakterizacijom identifikovane su i kvantifikovane komponente etarskih ulja vegetativnih izdanaka iz prirode i gajenih u kulturi *in vitro* na MS podlozi bez regulatora rastenja i MS podlozi na kojoj su izdanci imali najveću biomasu. Dominantna jedinjenja u svim uljima *M. pulegium* su oksidovani monoterpeni pulegon i menton. Kvalitativan sastav dominantnih jedinjenja u uljima izdanaka *M. pulegium* nije promenjen, ali je uočena kvantitativna promena u uslovima *in vitro*. Pulegon je zastupljeniji u ulju biljaka iz prirode, a menton u ulju dobijenom od izdanaka *M. pulegium* gajenih *in vitro*. Kvalitativni sastav dominantnih jedinjenja je različit u uljima izdanaka *M. croatica* različitog porekla. U sva tri ulja *M. croatica* oksidovani monoterpeni su znatno više zastupljeni nego monoterpenski ugljovodonici. U ulju biljaka *M. croatica* iz prirode, dominantne komponente su borneol, α -kadinen i β -vetivenen. U ulju izdanaka gajenih *in vitro* na MS podlozi bez fitohormona dominantne komponente su borneol, geranial, *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol i β -vetivenen. Dominantne komponente u ulju izdanaka *M. croatica* gajenih *in vitro* na podlozi MS sa 0,3 μ M kinetina su geranial, *cis-p*-menta-1(7),8-dien-2-ol i α -kadinen.

- Upoređivanjem hemijskog sastava ekstrakata različite polarnosti *M. pulegium* utvrđeno je 42,22% zajedničkih jedinjenja od ukupnog broja identifikovanih tj. identifikovana su u biljkama iz prirode i u izdancima gajenim u uslovima *in vitro*. Od ukupno identifikovanih jedinjenja *M. croatica* jedinjenja koja su zastupljena u izdancima iz prirode i u izdancima gajenim *in vitro* čine 67,65%.
- Metanolni ekstrakti izdanaka *M. pulegium* i *M. croatica* gajenih *in vitro* pokazuju veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na ekstrakte biljaka iz prirode. Veća antioksidativna aktivnost se pripisuje većem sadržaju fenolnih jedinjenja u izdancima gajenim *in vitro*.
- Analizom antimikrobne aktivnosti pokazano je da *M. pulegium* i *M. croatica* imaju malu antimikrobnu aktivnost. Metanolni ekstrakti *M. pulegium* i *M. croatica* delovali su na sve testirane sojeve, ali znatno slabije u odnosu na tri referentna antibiotika.
- Ispitana biološka aktivnost *M. pulegium* i *M. croatica* gajenih u uslovima *in vitro* je bolja (antioksidativna aktivnost) ili slična (antimikrobna aktivnost) biološkoj aktivnosti biljaka iz prirode i pored razlike u hemijskom sastavu sekundarnih metabolita.

LITERATURA

- 1) Abdin MZ. (2007) Enhancing bioactive molecules in medicinal plants. In Natural Products-Essential resources for human survival, edited by Y Zhu, B Tan, B Bay and C Liu, World Scientific Publishing Co. Pvt. Ltd., Singapore, pp.45-57.
- 2) Abou-Jawdah Y., Wardan R., Sobh H., Salameh A. (2004) Antifungal activities of extracts from selected Lebanese wild plants against plant pathogenic fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 377–386.
- 3) Adams RP. (2001) Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois.
- 4) Affonso VR., Bizzo HR., Lage CLS., Sato A. (2009) Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of *in vitro* plantlets of *Thymus vulgaris* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6392–6395
- 5) Agha MIH., Khaiat A. (2008) The chemical composition and antibacterial activity of the volatile oil from *Micromeria rupestris* L. (Lamiaceae). *Planta Medica*, 74 - PI54
- 6) Agostini G., Echeverrigaray S. (2006) Micropropagation of *Cunila incisa* Benth., a potential source of 1,8-cineole *Revista Brasileira da Plantas Mediciniais*, Botucatu, 8, 186-189.
- 7) Agrawal AA. (1999) Induced responses to herbivory in wild radish: effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology* 80, 1713–1723.
- 8) Ahmadi K., Sefidkon F., Osareh MH. (2008) Effect of drying methods on quantity and quality of essential oil three genotype of *Rosa damascena* Mill. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 24(2), 162-176.
- 9) Akin-Idowu PE., Ibitoye DO., Ademoyegun OT. (2009) Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African Journal of Biotechnology* 8(16), 3782-3788.
- 10) Al Watban AA. (2004) Anatomical studies on subfamily *Stachyoideae* species (Lamiaceae) growing naturally in the kingdom of Saudi Arabia. Submitted in partial fulfillment of the requirement for the Degree of Doctor of Philosophy in

Science (Botany) in the Department of Botany and Microbiology at the Faculty of Science, King Saud Univeristy 1425/2004.

- 11) Al-Bakhit AAM., Sawwan JS., Al-Mahmoud MS. (2007) *In vitro* propagation of two *Lavandula* Species: *Lavandula angustifolia* and *Lavandula latifolia* L. Medica, Jordan Journal of Agricultural Sciences, 3 (1), 16-24.
- 12) Alfermann AW., Petersen M. (1995) Natural product formation by plant cell biotechnology. Plant Cell Tissue Organ Culture 43,199–205.
- 13) Al-Hamwi M., Bakkour Y., Abou-Ela M., El-Lakany A., Tabcheh M., El-Omar F. (2011) Chemical composition and seasonal variation of the essential oil of *Micromeria fruticosa*. Journal of natural products. 4, 147-149.
- 14) Ali-Shtayeh MS., Al-Nuri MA., Yaghmour RMR., Faidi YR. (1997) Antimicrobial activity of *Micromeria nervosa* from Palestinian area. Journal of Ethnopharmacology, 58, 143.
- 15) Al-Rehailiy AJ. (2006) Composition of the essential oil of *Micromeria biflora* ssp. *arabica* K. Walth. Pakistan Journal of Biological Sciences 9(14), 2726-2728.
- 16) Al-Rehailiy AJ. (2006) Composition of the essential oil of *Micromeria biflora* ssp. *arabica* K. Walth. Pakistan Journal of Biological Sciences 9 (14), 2726-2728.
- 17) Alwan S., EL Omari K., Sukarieh I., Soufi H., Jama C., Zreika S. (2014) Effect of organ type , drying methods, and extraction time on yield and essential oil components of *Micromeria barbata* L. before flowering. International Journal of and Health Sciences, 4 (5), 43-47.
- 18) Ambid C., Fallot J. (1981) Role of the gaseous environment on volatile compound production by fruit cell suspension cultured *in vitro*. In: Schreier P, editor. Flavour '81. Berlin: de Gruyter, pp. 529–38.
- 19) Andrade LB., Echeverrugaray S., Fracaro F., Pau-letti GF., Rota L.(1999) “The Effect of Growth Regulators on Shoot Propagation and Rooting of Common Lavender (*Lavandula vera* DC),” Plant Cell Tissue and Organ Culture, 56(2), 79-83.
- 20) Angaji SA., Mousavi SF., Babapour E. (2012) Antioxidants: A few key points Annals of Biological Research 3 (8), 3968-3977.

- 21) Arigita L., Fernández B., González A., Tamés RS. (2005) Effect of the application of benzyladenine pulse on organogenesis, acclimatisation and endogenous phytohormone content in kiwi explants cultured under autotrophic conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 161–167.
- 22) Arikat NA., Jawad FM., Karam NS., Shibli RA. (2004) Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 100, 193-202.
- 23) Arslan M. (2012) Effects of intra-row spacing on herbage yield, essential oil content and composition of *Micromeria Fruticosa*, *Farmacia*, 60(6), 925-931.
- 24) Arulanandam LJP., Rose L., Rosakutty PJ., Ghanthikumar S. (2011) *In vitro* propagation of *Coleus Amboinicus* Lour. - an aromatic medicinal plant. *Journal of Basic and Applied Biology*, 5(1&2), 278-282.
- 25) Ascensao L., Marques N., Pais MS. (1995) Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany* 75, 619–626.
- 26) Ascensao L., Pais MS. (1998) The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: Histochemistry, ultrastructure and secretion. *Annals of Botany* 81, 263–271.
- 27) Asekun OT., Grierson DS., Afolayan AS. (2006) Influence of drying methods on the chemical composition and yield of the essential oil of *Leonotis leonurus*. *Journal of Scientific Research* 10, 61-64.
- 28) Azmir J., Zaidul ISM., Rahman MM., Sharif KM., Mohamed A., Sahena F., Jahurul MHA., Ghafoor K., Norulaini NAN., Omar AKM. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117, 426–436.
- 29) Bais HP., Walker TS., Schweizer HB., Vivanco JM. (2002) Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 983–985.
- 30) Bakkour Y., Alwan S., Soufi H., El-Ashi N., Tabchei M., El Omar F. (2012) Chemical composition of essential oil extracted from *Micromeria barbata* growing and their antimicrobial and antioxidant properties. *Journal of Natural Products*, 5, 116-120.

- 31) Bandurski RS., Cohen JD., Slovin J. (1995) Auxin biosynthesis and metabolism. In: Davies, P. J., ed. Plant hormones. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 39-65.
- 32) Baser KHC., Demircakmaka B., Duman H. (1997 a) Composition of the Essential Oil of *Micromeria cremnophila* Boiss. et Heldr. subsp. *amana* (Rech.fil) P.H.Davis. Journal of Essential Oil Research 9(6), 725-726.
- 33) Baser KHC., Demirci B. (2007) Chemistry of essential oils, In: Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing, Sustainability. (Berger, R.M. Ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 648.
- 34) Baser KHC., Kirimer N., Duman H. (1997 b) Composition of the essential oil of *Micromeria dolichodontha* P. H. Davis, Flavour and fragrance journal 12(4), 289-291.
- 35) Baser KHC., Kirimer N., Özek T., Tümen G., Karaer F. (1996) Essential oil composition of three Labiatae endemic to Turkey (*Micromeria fruticosa* (L.) Druce subsp. *giresunica* P. H. Davis, *Sideritis lycia* Boiss. et Heldr. and *S. arguta* Boiss. et Heldr.). Journal of Essential Oil Research 8(6), 699-701.
- 36) Baser KHC., Kirimer N., Özeka T., Tümen G. (1995) Essential Oil of *Micromeria carminea* P.H. Davis. Journal of Essential Oil Research 7(4), 457-458.
- 37) Baskaran P., Ncube B., Van Staden J. (2012) *In vitro* propagation and secondary product production by *Merwillia plumbea* (Lindl.) Speta. Plant Growth Regulation, 67 (13), 235-245.
- 38) Bauer N., Leljak-Levanic D., Jelaska S. (2004) Rosmarinic acid synthesis in transformed callus culture of *Coleus blumei* Benth. Z Naturforsch 59 (C), 554–560.
- 39) Begum F., Amin MN., Azad MAK. (2002) *In vitro* rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum* L., Plant Tissue Culture 12(1), 27-35.
- 40) Bellino A., Venturella P., Marcenó C. (1980) Naringenin and neopocirin from *Micromeria* species and *Calamintha nepeta*. Fitoterapia 51: 163-165.
- 41) Bennett IJ., McComb JA., Tonkin CM. McDavid DAJ. (1994) Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. Annals of Botany 74, 53-58.

- 42) Bentham G. (1829) *Micromeria*. – Bot. Reg. 15: t. 1282.
- 43) Benz BW., Martin CE. (2006) Foliar trichomes, boundary layers, and gas exchange in the species of epiphytic *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Journal of Plant Physiology*, 163, 648–656.
- 44) Bertoli A., Lucchesini M., Mensuali-Sodi A., Leonardi M., Doveri S., Magnabosco A., Pistelli L. (2013) Aroma characterisation and UV elicitation of purple basil from different plant tissue cultures. *Food Chemistry*, 141, 776-787.
- 45) Bežić N., Dunkić V., Vuko E. (2013) Antiphytoviral activity of essential oils of some Lamiaceae species and there most important compounds on CMV and TMV. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.) FORMATEX 982-988.
- 46) Bival Štefan M., Jelić D., Vladimir-Knežević S., Trzun M., Borić F., Paravić-Radičević A., Karmen B., Blažeković B. (2010) Anti-inflammatory effects of ethanolic extrcts from *Micromeria* species. *Planta medica*, 1344.
- 47) Bogosavljević S., Zlatković B., Randelović V. (2007) Flora klisure Svrljiškog Timoka. 9th Symposium on Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions Niš (Serbia), Proceeding, 41-54.
- 48) Boissier E. (1879) *Flora orientalis* 4. – Basel and Genève.
- 49) Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161, 839–851.
- 50) Brauchler C., Meimberg H., Abele T., Heubl G. (2005) Polyphyly of the Genus *Micromeria* Benth. (Lamiaceae): Evidence from cpDNA Sequence Data. *Taxon.*, 54(3), 639-650.
- 51) Britton G. (1983) *The biochemistry of natural pigments*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 52) Butler LG. (1992) Protein-polyphenol interactions: nutritional aspects, in *Proc. 16th Int.Conf. Group Polyphen.*, 16, Part II, 11–18.
- 53) Cai YZ., Xing J., Sun M., Zhan ZQ., Corke H. (2005) Phenolic Antioxidants (Hydrolyzable Tannins, Flavonols, and Anthocyanins) Identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from *Rosa chinensis* Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(26):9940-9948. 22.

- 54) Cao J., Qi LW., Chen J., Yi L., Li P. Rena MT., Lia YJ. (2009) Application of liquid chromatography–electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for analysis and quality control of compound Danshen preparations, *Biomedical Chromatography*, 23, 397–405 9 croatica
- 55) Carikci S. (2013) The essential oil components of five *Micromeria* species grown in Anatolia, *BAÜ Fen Bil. Enst. Dergisi Cilt* 15(2), 73-79.
- 56) Caruso JL., Callahan J., DeChant C., Jayasimhulu K., Winget GD. (2000) Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*. *Plant Cell Report*, 19, 500–503.
- 57) Carvalho LC., Osorio ML., Chaves MM., Amancio S. (2001) Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and chestnut plantlets under *ex vitro* acclimatization. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 67, 271-280.
- 58) Chandra M., Prakash O., Kumar Bachheti R., Kumar M., Kumar A. (2013) Pant essential oil composition and pharmacological activities of *Micromeria biflora* (Buch.- Ham. Ex D. Don) Benth. collected from Uttarakhand region of India, *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(35), 2538-2544.
- 59) Chater OA., Guinea E. (1972) *Micromeria* Benth. In: Tutin GT, Heywood HV, Burges AN, Moore MD, Valentine HD, Walters MS and Webb AD. (eds.), *Flora Europaea*, vol. 3, Cambridge University Press, London, pp. 167-170.
- 60) Chen H., Chen F., Chiu FC., Lo CM. (2001) The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Enzyme and Microbial Technology* 28, 100–105.
- 61) Chen JZ., Chou GX., Wang CH., Yang L., Bligh SW., Wang ZT. (2010) Characterization of new metabolites from *in vivo* biotransformation of norisoboldine by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52(5):687–693. 27.
- 62) Chen L., Qi J., Chang YX., Zhu D., Yu B. (2009) Identification and determination of the major constituents in Traditional Chinese Medicinal formula Danggui-Shaoyao-San by HPLC–DAD–ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50(2):127–137. 17.

- 63) Cheynier V., Comte G., Davies KM., Lattanzio V., Martens S. (2013) Plant Phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1-39.
- 64) Choi KT., Ahn IO., Park JC. (1994) Production of ginseng saponin in tissue culture of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Mayer). *Russian Journal of Plant Physiology*, 41, 784-788.
- 65) Clark RJ., Menary RC. (1980) Environmental effects on peppermint (*M. piperita* L) Effect of day length, photon flux density, night and day temperature on yield and composition of peppermint oil. *Australian Journal of Plant Physiology*, 7, 685–692.
- 66) Cos P., Vlieinck AJ., Berghe DV., Maes L. (2006) Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'Proof-of-Concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290-302.
- 67) Cosentino S., Tuberose CIG., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. (1999) *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130–135.
- 68) Costa P., Goncalves S., Valentao P., Andrade PB., Romano A. (2013) Accumulation of phenolic compounds in *in vitro* cultures and wild plants of *Lavandula viridis* L'Hér and their antioxidant and anti-cholinesterase potential. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 69-74.
- 69) Cowan MM. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4), 564-582.
- 70) Croteau R. (2000) Natural products (secondary metabolites) In: *Biochemistry and molecular biology of plants* (Buchanan, B.B., Ed.). American Society of Plant Physiology, Rockville, MD, USA. pp: 1250-1318.
- 71) Cuenca S., Amo-Marco JB. (2000) *In vitro* propagation of two Spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation. *In Vitro Cell and Developmental Biology Plant* 36, 225-229.
- 72) Cuvelier ME., Berset C., Richard H. (1996) Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plants and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemist' Society* 73, 645-652.

- 73) Cuyckens F., Claeys M. (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1-15.
- 74) Dakah A., Suliman M., Zaid S. (2014) Effect of some environmental stress in tissue culture media on *in vitro* propagation and antioxidant activity of medicinal plant *Ziziphora canescens* Benth. *Adv in Nat Appl Sci*, 8 (4), 224.
- 75) Dakah A., Zaid S., Suliman M., Abbas S., Wink M.(2013) *In vitro* propagation of the medicinal plant *Ziziphora tenuior* L. and evaluation of its antioxidant activity. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- 76) David R., Carde JP. (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du réactif nadi. *Compte-Rendu de l'Académie des Sciences, Paris* 258, 1338–1340.
- 77) de Klerk GJ. (2002) Rooting of microcuttings: theory and practice. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 38,415–422.
- 78) Dell B. and McComb J. (1977) Glandular hair formation and resin secretion in *Eremophila fraseri* F. Meull. (*Myoporaceae*) *Protoplasma*, 92, 71-86.
- 79) Diab Y., Auezova L., Chebib H., Chalchat JC.(2005) Chemical composition of the essential oil of *Micromeria libanotica* Boiss., an endemic species of Lebanon. *Journal of essential oil research* 17(4), 449-450.
- 80) Diaz MS., Palacio L., Figueroa AC., Goleniowski ME.(2012) *In Vitro* Propagation of Muna-Muna (*Clinopodium odorum* (Griseb.) Harley) *Biotechnology Research International*, 1-6.
- 81) DiCosmo F., Misawa M. (1995) Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production, *Biotechnology Advances*, 13(3), 425-453.
- 82) Diklić N. (1974) *Micromeria* Benth. In: Josifović, M. (ed.): *Flora Srbije* 6:458-462. – Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd.
- 83) Diklić N., Nikolić V. (1986) *Micromeria pulegium* (Roch.) Benth In: Sarić, M., Diklić, N. (eds.) *Flora SR Srbije*. 10: 186. - Srpska Akademija Nauka i Umetnosti. Beograd.
- 84) Dixon RA., Paiva NL. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.

- 85) Dobravalskyte D., Venskutonis P., Rimantas Talou T. (2012) Antioxidant proper-ties and essential oil composition of *Calamintha grandiflora* L. Food Chemistry. 135,1539–1546.
- 86) Dode LB, Seixas FK, Schuch MW, Braga EJB, Bobrowski VL (2003) *In vitro* clonal propagation of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). J. Sci. Maringá, 25, 439-441.
- 87) Dornenburg H., Knorr D. (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. Enzyme and Microbial Technology 17, 674-684.
- 88) Driver JA., Suttle GR.(1987) “Nursery Handling of Propagules,” In: J. M. Bonga and D. J. Durzan, Eds., Cell and Tissue Culture in Forestry, Dordrecht, Netherlands, 320-335.
- 89) Dudai N., Chaimovitsh D., Larkov O., Fischer R., Blaicher Y., Mayer AM. (2009) Allelochemicals released by leaf residues of *Micromeria fruticosa* in soils, their uptake and metabolism by inhibited wheat seed. Plant Soil 314, 311–317.
- 90) Dudai N., Larkov O., Ravid U., Putievsky E., Lewinsohn E. (2001) Development control of monoterpene content and composition in *Micromeria fruticosa* (L.) Druce. Annals of Botany, 88(3), 349-354.
- 91) Dudai N., Poljakoff-Mayber A., Mayer AM., Putievsky E., Lerner HR.(1999) Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. Journal of Chemical Ecology, 25(5), 1079-1089.
- 92) Dunstan DI., Turner KE., Lazaroff WR. (1985) Propagation *in vitro* of the apple rootstock M4: effect of phytohormones on shoot quality, Plant Cell Tissue and Organ Culture. 4, 55–60.
- 93) Duru ME., Öztürk M., Ugur A., Ceylan O. (2004) The constituents of essential oil and *in vitro* antimicrobial activity of *Micromeria cilicica* from Turkey. Journal of Ethnopharmacology 94, 43–48.
- 94) Echeverrigaray S., Carrer R P., Andrade L B.(2010) Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. through Axillary Shoot Proliferation, Brazilian archives of biology and technology, 53(4), 883-888.

- 95) El-Keltawi NE., Croteau R. (1987) Influence of foliar applied cytokinins on growth and essential oil content of several members of the Lamiaceae. *Phytochemistry* 26(4), 891-895.
- 96) Ellis BE., Towers GHN. (1970) Biogenesis of rosamrinic acid in *Mentha*. *Journal of Biochemistry*, 118, 291-297.
- 97) El-Seedi HR., Khatta A., Gaara AHM., Mohamed TK., Hassan NA., El-kattan AE. (2008) Essential Oil Analysis of *Micromeria nubigena* H.B.K. and its Antimicrobial Activity. *Journal of Essential Oil Research* 20(5), 452-456.
- 98) European Pharmacopoeia (2011), 7th Edition. Council of Europe, Strasbourg.
- 99) Fahn A. (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*. 108, 229–257.
- 100) Fahn A., (2000) Structure and function of secretory cells, In: Hallahan D.L., Gray J., Callow J.A. (Eds.), *Advances in botanical research incorporating advances in plant pathology, Plant trichomes*, Vol. 31, Academic Press, London.
- 101) Farooqi AHA., Khan A., Sharma S (2003) Effect of kinetin and chlormequat chloride on growth, leaf abscission and essential oil yield in *Mentha arvensis*. *Indian Perfumer*, 47, 359-363.
- 102) Fay MF.(1992) Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods, *In Vitro Cell and Developmental Biology*. 28, 1-4.
- 103) Fernández V., Khayet M., Montero-Prado P., Heredia-Guerrero JA. , Liakopoulos G., Karabourniotis G., Río V., Domínguez E., Tacchini I., Nerín C., Val J. and Heredia A. (2011) New insights into the properties of pubescent surfaces: peach fruit as a model, *Plant Physiology* 156 (4), 2098-2108.
- 104) Fett-Neto AG., Melanson SJ., Sakata K., DiCosmo F. (1993) Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. *Biotechnology*, 11, 731-734.
- 105) Figueiredo RO., Delachiave MEA., Ming LC. (2006) Reguladores vegetais na producao de biomassa e teor de óleos essenciais em *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, em diferentes épocas do ano. *Rev Bras Pl Med* 8(3), 31-35.
- 106) Fontanel A., Tabata M. (1987) Production of secondary metabolites by plant tissue and cell cultures. Present aspects and prospects. *Nestle Research News*, 92-103.

- 107) Forenbacher S. (1990) Velebit i njegov biljni svijet. Školska knjiga, Zagreb, 587 – 589.
- 108) Formisano C., Mignola E., Rigano D., Senatore F., Bellone G., Bruno M., Rosselli S.(2007) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Micromeria fruticulosa* (Bertol.) Grande (Lamiaceae) growing wild in Southern Italy. Flavour and Fragrance Journal 22(4), 289–292.
- 109) Formisano C., Oliviero F., Rigano D., Saabb AM., Senatore F. (2014) Chemical composition of essential oils and *in vitro* antioxidant properties of extracts and essential oils of *Calamintha organifolia* and *Micromeria myrtifolia*, two Lamiaceae from the Lebanon flora. Industrial Crops and Products 62, 405–411.
- 110) Fox JL. (2006) Turning plants into protein factories. Nature Biotechnology. 24, 1191–1193.
- 111) Fraga CG., Galleano M., Verstraeten SV., Oteiza PI. (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. Molecular Aspects of Medicine, 31(6) 435-445.
- 112) Fraternale D., Giamperi L., Ricci D., Rocchi MBL., Guidi L., Epifanio F., Marcotullio MC. (2003) The Effect of TRIA on micropropagation and on secretory system of *Thymus mastichina*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 74 (1), 87-97.
- 113) George EF and PD Sherrington (1984) Plant propagation by tissue culture. (Exgetics Ltd. Basingstoke, England.
- 114) Gersbach PV. (2002) The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). Annals of Botany. 89: 255–260.
- 115) Ghanti K., Kaviraj CP., Venugopal RB., Jabeen FTZ., Rao S. (2004) Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. from shoot tip and nodal explants, Indian Journal of Biotechnology 3, 594-598.
- 116) Goncalves S., Romano A. (2013) *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites, Biotechnology Advances 31,166–174.

- 117) Gostin I. (2008) Effects of different plant hormones on *Salvia officinalis*, cultivated *in vitro*, International Journal of Botany 4 (4), 430 – 436.
- 118) Grzegorzczak I., Królicka A., Wysokińska H.(2006) Establishment of *Salvia officinalis* L. hairy root cultures for the production of rosmarinic acid. Z Naturforsch 61(C), 351–356.
- 119) Grzegorzczak I., Matkowski A., Wysokin'ska H. (2007) Antioxidant activity of extracts from *in vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. Food Chemistry 104, 536–54.
- 120) Güllüce M., Sökmen M., Şahin F., Sökmen A., Adigüzel A., Özer H. (2004) Biological activities of the essential oil and methanolic extract of *Micromeria fruticosa* (L) Druce ssp *serpyllifolia* (Bieb) PH Davis plants from the eastern Anatolia region of Turkey. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84(7), 735–741.
- 121) Gundlach H., Muller MJ., Kutchan TM., Zenk MH. (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor induced plant-cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 2389–2393.
- 122) Guo J., Yuan Y., Liu Z., Zhu J. (2013) Development and Structure of Internal Glands and External Glandular Trichomes in *Pogostemon cablin*. PLOS ONE 8(10): e77862. 1-12.
- 123) Hakkim Fl., Shankar Cg., Girija S. (2007) Chemical composition and antioxidant property of holy basil (*Ocimum sanctum* L.) leaves, stems and inflorescence and their *in vitro* callus cultures. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 55, 9109.
- 124) Hanamanthagouda MS., Kakkalameli SB., Naik PM., Negalla P., Seetharamareddy HR., Murthy HN. (2010) Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. Food Chemistry, 118, 836-839.
- 125) Hannibal TM., van Staden J., Makunga NP. (2010) *In vitro* seed germination and cultivation of the aromatic medicinal *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.) provides an alternative source of α -bisabolol. Plant Growth Regulation, 61, 287–295.
- 126) Harborne J. B., The Flavonoids: advances in research since 1986. Chapman and Hall, Cambridge, UK, 1994.

- 127) Harborne JB. (1999) Classes and functions of secondary products, in: N.J. Walton, D.E. Brown (Eds.), *Chemicals from Plants, Perspectives on Secondary Plant Products*, Imperial College Press, 1–25.
- 128) Harley RM., Atkins S., Budantsev A., Cantino PD., Conn BJ., Grayer R., Harley MM., De Kok R., Krestovskaja T., Morales R., Paton AJ., Ryding O., Upson T. (2004) Labiatae. Pp. 167-275 in: Kadereit, J. W. (ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants*, vol. 7. Springer, Berlin
- 129) Harpaz S., Glatman L., Drabkin V., Gelman A. (2003) Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*, 66(3), 410–417.
- 130) Hartmann HT., Kester DE., Davies JR., F.T. et al. (2002) *Hartmann and Kester's Plant Propagation: Principles and Practices*. 7.ed. New Jersey: Prentice Hall, 880p.
- 131) Hartmann T. (1996): Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80(1): 177-188.
- 132) Hazarika BN. (2003) Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, 85(12), 1704-1712.
- 133) Herken EN., Celik A., Aslan M., Aydınlık N. (2012) The constituents of essential oil: antimicrobial and antioxidant activity of *Micromeria congesta* Boiss. & Hausskn. ex Boiss. from East Anatolia. *Journal of medicinal food*, 15(9), 835-9. DOI:10.1089/jmf.2011.0315
- 134) Himejima M., Kubo I. (1993) Fungicidal activity of polygodial in combination with anethole and indole against *Candida albicans*. *Journal of Agricultural and Food Sciency.*, 41, 1776.
- 135) Honda A., Miyazaki T., Ikegami T., Iwamoto J., Yamashita K., Numazawad M., Matsuzaki Y. (2010) Highly sensitive and specific analysis of sterol profiles in biological samples by HPLC–ESI–MS/MS. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 121:556–564. 16.
- 136) Huang SS., Kirchoff BK., and Liao JP. (2008) The capitate and peltate glandular trichomes of *Lavandula pinnata* L. (Lamiaceae): histochemistry, ultrastructure, and secretion. *J. Torrey Bot. Soc.* 135,155-167.

- 137) Huang SS., Kirchoff BK., Liao JP. (2008) The capitate and peltate glandular trichomes of *Lavandula pinnata* L. (Lamiaceae): histochemistry, ultrastructure, and secretion, *Journal of the Torrey Botanical Society* 135(2), 155–167.
- 138) Hurtado-Fernández E., Gómez-Romero M., Carrasco-Pancorbo A., Fernández-Gutiérrez A. (2010) Application and potential of capillary electrophoresis methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53, 1130-1160.
- 139) Ioio RD., Nakamura K., Moubayidin L., Perilli S., Taniguchi M., Morita MT., Aoyama T., Costantino P., Sabatini S. (2008) Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Science* 322,1380–1384.
- 140) Jančić R., Stošić D., Mimica-Dukić N., Lakušić B. (1995), *Aromatične biljke Srbije*, NIP Dečije Novine, Gornji Milanovac.
- 141) Janković MM. (1990) *Fitogeografija*, Naučna knjiga, Beograd.
- 142) Jayakumar S., Ramalingam R. (2013), Influence of additives on enhanced *in vitro* shoot multiplication of *Orthosiphon aristatus* (Blume) Miq. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(3), 338-345.
- 143) Jia P., Gao T., and Xin H. (2012) Changes in structure and histochemistry of glandular trichomes of *Thymus quinquecostatus* Celak. *The ScientificWorld Journal* 2012, 7
- 144) Jovanović SV., Steenken S., Simić MG., Hara Y. (1998) Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. In: Rice Evans CA., Parer L. eds *Flavonoids in health and disease* Vol 1. New York: Marcel Dekker, 137.
- 145) Juliani Jr HR., Koroch AR., Juliani HR., Trippi VS. (1999) "Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Trone," *Plant Cell Reports*, 59(3), 175-179.
- 146) Juliano C., Mattana A., Usai M. (2000) Composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herbarbarona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal Of Essential Oil Research*, 12, 516–522.

- 147) Kadis C., Kounnamas C., Georgiou K.(2010) Seed germination and conservation of endemic, rare and threatened aromatic plants of Cyprus. Israel Journal of Plant Science, 58, 251-261.
- 148) Kandasamy S., Rajinikanth R., Govarthan M., Paul A., Selvankumar T., Sengottaiyan A. (2013) Antioxidant potential and secondary metabolites in *Ocimum sanctum* L. at various habitats. Journal of Medicinal Plants Research 7(12), 706-712.
- 149) Karuppusamy S. (2009) A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research 3(13), 1222-1239.
- 150) Kastori R., Ilin Ž., Maksimović I., Putnik-Delić M.(2013) Kalijum u ishrani biljaka - kalijum i povrće, Poljoprivredni fakultet Novi Sad,. 123-125.
- 151) Khan J., Rauf M., Ali Z., Rashid H., Khattack MS. (1999) Different stratification techniques on seed germination of *Pistachio*. Pakistan Journal of Biological Sciency 2, 1412-1414.
- 152) Kiferle C., Lucchesini M., Mensuali-Sodi A., Maggini R., Raffaelli A., Pardossi A. (2011) Rosmarinic acid content in basil plants grown *in vitro* and in hydroponic. Central European Journal of Biology, 6, 946-957.
- 153) Kirimer N., Ozek T., Baser KHC., Harmandar M. (1993 a) The Essential Oil of *Micromeria fruticosa* (L.) Druce subsp. *serpyllifolia* (Bieb.) P. H. Davis. Journal of Essential Oil Research 5 (2), 199-200.
- 154) Kirimer N., Tümen G., Özek T., Baserc KHC.(1993 b) The Essential Oil of *Micromeria fruticosa* (L.) Druce subsp. *barbata* (Boiss & Kotschy) P. H. Davis of Turkish Origin. Journal of Essential Oil Research 5(1), 79-80.
- 155) Kitić D. (2006) Divlji bosiljak, hemijsko i mikrobiološko ispitivanje, Zadužbina Andrejević, Beograd.
- 156) Kliebenstein DJ., Osbourn A. (2012), Making new molecules – evolution of pathways for Novel metabolites in plants. Current Opinionin Plant Biology, 15, 415-23.
- 157) Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H., Weis, N. (1989) Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. Journal of. Essential Oil Research, 1, 119–128.

- 158) Kodo Y. and Okozava Y. (1980) Cytokinin production by *Asparagus* shoot apex cultured *in vitro*. *Physiological Plantarum* 49 193-197.
- 159) Kovačević N. (2004) Osnovi farmakognozije. Treće izdanje. Institut za farmakognoziju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu. Srpska školska knjiga, Beograd.
- 160) Kremer D., Dragojević Miler I., Stabentheiner E., Vitali D., Koprivanec M., Rusčić M., Kosalec I., Bezić N., Dunkić V. (2012 a) Phytochemical and micromorphological traits of endemic *Micromeria pseudocroatica* (Lamiaceae). *Natural Products Communications* 7(12), 1667-70.
- 161) Kremer D., Dunkić V., Ruščić M., Matevski V., Ballian D., Bogunić F., Eleftheriadou E., Stešević D., Kosalec I., Bezić N., Stabentheiner E. (2014 a) Micromorphological traits and essential oil contents of *Micromeria kernerii* Murb. and *M. juliana* (L.) Benth. (Lamiaceae) *Phytochemistry* 98, 128–136.
- 162) Kremer D., Dunkić V., Stešević D., Kosalec I., Ballian D., Bogunić F., Bezić N., Stabentheiner E. (2014 b) Micromorphological traits and essential oil of *Micromeria longipedunculata* Bräuchler (Lamiaceae). *Central European Journal of Biology*, 9 (5), 559-568.
- 163) Kremer D., Stabentheiner E., Dunkić V., Dragojević Ml., Vujić L., Kosaleca I., Balliane B., Bogunić F., Bezić N. (2012 b) Micromorphological and Chemotaxonomical Traits of *Micromeria croatica* (Pers.) Schott. *Chemistry & Biodiversity* 9, 755-768.
- 164) Kumara Swamy M., Anuradha M. (2010) Micropropagation of *Pogostemon cablin* Benth. through direct regeneration for production of true to type plants, *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 20(1), 81-89.
- 165) Kumara Swamy M., Balasubramanya S., Anuradha M. (2010) *In vitro* multiplication of *Pogostemon cablin* Benth. through direct regeneration *African Journal of Biotechnology* 9(14), 2069-2075.
- 166) Lakušić B, Lakušić D, Ristić M, Marčetić M, Slavkovska V. (2014): Seasonal variations in the composition of the essential oils of *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae). *Natural Product Communications*, 9 (6): 859-862.
- 167) Lakušić B, Ristić M, Slavkovska V, Milenković M, Lakušić D. (2011) Environmental and seasonal impacts on the chemical Composition of *Satureja*

- horvatii* Šilić (Lamiaceae) Essential Oils. Chemistry & Biodiversity, 8, 3, 483-493.
- 168) Lakušić B, Ristić M, Slavkovska V, Stojanović D, Lakušić D. (2013a): Variations in essential oil yields and compositions of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) at different developmental stages. Botanica Serbica, 37(2), 127-140.
- 169) Lakušić B. (1995), Sekretorne strukture aromatičnih biljaka. U: Jančić R., Stošić D., Mimica-Dukić N., Lakušić B., Aromatične biljke Srbije, 17-40, NIP Dečije Nivine, Gornji Milanovac.
- 170) Lakušić B., Lakušić D., Ristić M., Marčetić M., Slavkovska V. (2014): Seasonal variations in the composition of the essential oils of *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae). Natural Product Communications, 9 (6): 859-862.
- 171) Lakušić D, Ristić M, Slavkovska V, Šinžar-Sekulić J, Lakušić B. (2012) Environment-related variations of the composition of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in the Balkan Peninsula. Chemistry & Biodiversity, 9 (7): 1286-1302.
- 172) Lakušić D., Ristić M., Slavkovska V., Lakušić B. (2013b) Seasonal Variations in the composition of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae). Natural Product Communications, 8 (1): 131-134.
- 173) Lambert RJW., Skandamis PJ., Coote G., Nychas JE. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology, 91(3), 453-462.
- 174) Lawrence BM. (1989) The Essential Oil of *Micromeria teneriffae* Benth. Journal of Essential Oil Research 1(1).
- 175) Lee KW., Kim YJ., Lee HJ., Lee CY. (2003) Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51:7292-7295
- 176) Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011): The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. Food Chemistry, 125(2): 288-306.
- 177) Levin DA. (1973) The role of trichomes in plant defence. Q Rev Biol 48:3-15

- 178) Li H B., Cheng KW., Wong CC., Fan KW., Chen F., Jiang Y. (2007), Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* 102, 771–776.
- 179) Li R., Zhou Y., Wu Z., Ding L. (2006) ESI-QqTOF-MS/MS and APCI-IT-MS/MS analysis of steroid saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica*. *Journal of Mass Spectrometry* 41:1–22. 24.
- 180) Li ZH., Wang Q., Ruan X., Pan CD., Jiang DA. (2010) Phenolics and plant alleopathy. *Molecules*, 15, 8933-8952.
- 181) Lin LZ., Harnlya J., Uptonb R. (2009) Comparison of the Phenolic Component Profiles of Skullcap (*Scutellaria lateriflora*) and Germander (*Teucrium canadense* and *T.chamaedrys*) a Potentially Hepatotoxic Adulterant. *Phytochemical Analysis* 20:298-306. 28.
- 182) Lin LZ., He XG., Lindenmaier M., Nolan G., Yang J., Cleary M., Qiu SX., Cordell GA. (2000) Liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus*. *Journal of Chromatography A* 876:87–95. 20.
- 183) Liu G., Ma J., Chen Y., Tian Q., Shen Y., Wang X., Chen B., Yao S. (2009) Investigation of flavonoid profile of *Scutellaria bacalensis* Georgi by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216:4809–4814. 25.
- 184) Liu T., Belov M., Jaitly N., Qian WJ., Smith R. (2007) Accurate Mass Measurements in Proteomics. *Chem. Rev*, 107(8), 3621.
- 185) Lopez V., Akerreta S., Casanova E., Garcia-Mina JM., Caverio RY., Calvo MI. (2007) *In vitro* antioxidant antirhizopus activities of Lamiaceae herbal extracts. *Plant Foods and Human Nutrition.*, 62, 151-155
- 186) Luo HF., Li Q., Yu S., Badger TM., Fang N. (2005) Cytotoxic Hydroxylated Triterpene Alcohol Ferulates from *Rice Bran*. *Journal of Natural Products* 68(1): 94-97. 23.
- 187) Luo SH., Luo Q., Niu XM., Xie MJ., Zhao X., Schneider B., Gershenzon J., Li SH. (2010) Glandular trichomes of *Leucosceptrum canum* harbor defensive sesterterpenoids. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 4471-4475.

- 188) Maffei M., Chialva F., Sacco T. (1989) Glandular trichomes and essential oils in developing peppermint leaves. *New Phytologist* 111, 707–716.
- 189) Mahmoud SS., Croteau RB. (2002) Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7(8), 366-373.
- 190) Maity S K., Kundu AK., Tiwary BK. (2011) Rapid and large scale micropropagation of true to type clone of *Mentha arvensis* Linn. (Lamiaceae) -A valuable medicinal plant, *Indian J. Applied & Pure Bio.* 26(2), 193-198.
- 191) Mallavarapua GR., Ramesha S., Subrahmanyamb K. (1997) Composition of the Essential Oil of *Micromeria biflora*. *Journal of Essential Oil Research* 9(1), 23-26.
- 192) Marić MM. (1995) *Kultura biljnih tkiva*, izdavačka kuća "Draganić".
- 193) Marin M., Jasnić N., Ascensão L. (2013) Histochemical, micromorphology and ultrastructural investigation in glandular trichomes of *Micromeria thymifolia*. *Botanica Serbica* 37(1), 49-53.
- 194) Marin P.D. (1996) Orašice i trihome u familiji Lamiaceae. *Biološki fakultet, Beograd*
- 195) Marin PD. (2003), *Biohemijska i molekularna sistematika biljak*. NNK
- 196) Marin PD., Grayer RJ., Veitch NC., Kite GC., Harborne JB. (2001) Acacetin glycosides as taxonomic markers in *Calamintha* and *Micromeria*, *Phytochemistry* 58, 943-947.
- 197) Marinković B., Marin PD., Knežević-Vukčević J., Soković MD., Brkić D. (2002) Activity of essential oils of thee *Micromeria* spesies (Lamiaceae) againid micromycetes and bacteria. *Phytoterapy Research*, 16(4), 336-339.
- 198) Marinković B., Marin PD., Soković M., Duletić-Lausevi S., Vukojević J. (2003) Antifungal effect of the essential oil of two *Micromeria* (Lamiaceae) species. *Boccone* 16(2), 1113-1116.
- 199) Masoudi S., Azad L., Arabshahi B., Yari M., Jamzad M., Akhlaghi H., Motevalizadeh A., Rustaiyan A. (2009) Volatile Constituents of *Micromeria persica* Boiss., *Hymenocrater platystegius* Rech. f. and *Scutellaria pinnatifida* A. Hamilt. subsp. *pinnatifida*, Three Labiatae Herbs Growing Wild in Iran, *Journal of Essential Oil Research* 21, 515-518.

- 200) Massot B., Milesi S., Gontier E., F. Bourgaud F., Guckert A. (2000) Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 62, 11.
- 201) Matkowski A. (2008) Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants. A review, Biotechnology Advances 26, 548–560.
- 202) Matsubara K., Shigekazu K., Yoshioka T., Morimota T., Fujita Y., Yamada Y. (1989) High density culture of *Coptis japonica* cells increases berberine production. Z Chem. Tech. Biotech., 46, 61-69.
- 203) Matsumoto T., Ikeda T., Kanno N., Kisaki,T., Noguchi M. (1980) Agricultural and Biological Chemistry, 44, 967-969.
- 204) Mazher AAM., Zaghloul SM., Mahmoud SA., Siam HS. (2011) Stimulatory effect of kinetin, ascorbic acid and glutamic acid on growth and chemical constituents of *Codiaeum variegatum* L. Plants, American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 10 (3), 318-323.
- 205) McGaw BA., Burch LR. (1995) Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: Davies, PJ., ed. Plant hormones. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 98-117.
- 206) Medana C., Massolino C., Pazzi M., Baiocchi C. (2006) Determination of salvinorins and divinorins in *Salvia divinorum* leaves by liquid chromatography/multistage mass spectrometry. Rapid Communication in Mass Spectrometry 20:131-136. 21.
- 207) Meimberg H., Abele T., Bräuchler C., McKay JK., Pérez de Paz PL. end Heubl G. (2006) Molecular evidence for adaptive radiation of *Micromeria* Benth. (Lamiaceae) on the Canary Islands as inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences and ISSR fingerprint data. Molecular Phylogenetics and Evolution 41, 566-578.
- 208) Mishra, R. K., Kumar, A., Shukla, A. C., Tiwari, P., Dikshit, A. (2010): Quantitative and Rapid Antibacterial Assay of *Micromeria biflora* Benth. Leaf Essential Oil Against Dental Caries Causing Bacteria Using Phylogenetic Approach. Journal of Ecobiotechnology, 2(4), 22-26.

- 209) Mišić D., Grubičić D., Konjević R. (2006) Micropropagation of *Salvia brachyodon* through nodal explants. *Biologia Plantarum* 50(3), 473-476(4).
- 210) Mitić V., Stankov-Jovanović V., Jovanović O., Palić I., Djordjević A., Stojanović G. (2011) Composition and Antioxidant Activity of Hydrodistilled Essential Oil of Serbian *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber ssp *chia* (Schreber) Arcangeli (Article), *Journal of essential oil research*, 23(6), 70-74.
- 211) Molia MFA., Kwapata MB. (2000) Apomictic embryo development and survival in *Uapaca kirkiana* under *in vitro* and *in vivo* seed germination. *Scientia Horticulturae* 83, 139–147.
- 212) Moncousin C.(1991) Rooting of *in vitro* cutting. In: Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in Agriculture and Forestry: High Tech and Micropropagation I*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 231-262.
- 213) Mooney HA., Harrison AT., Morrow PA. (1975) Environmental limitations of photosynthesis on a Clifornia evergreen srub (*Heteroeles erbutifolia*). *Oecologia*. 19, 293-302.
- 214) Morales R. (1993) Sinopsis y distribución del género *Micromeria* Bentham. – *Bot. Complut.* 18:157-168.
- 215) Mraz P. (1998) The structure and development of the glandular trichomes of *Teucrium montanum* (Lamiaceae). *Biologia, Bratislava* 53 (1), 65-72.
- 216) Mulabagal V., Tsay HS. (2004) Plant Cell Cultures - An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2 (1), 29-48.
- 217) Mulder-Krieger T., Verpoorte R., Svendse A., Scheffer J. (1988) Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 13, 85–114.
- 218) Murakami Y., Omoto T., Asai I., Shimomura K., Yoshihira K., Ishimaru K. (1998) Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 53, 75–78.
- 219) Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 15, 473-497.

- 220) Musarurwa HT., van Staden J., Makunga NP. (2010) *In vitro* seed germination and cultivation of the aromatic medicinal *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.) provides an alternative source of α -bisabolol, Plant Growth Regulation, 61,287–295.
- 221) Namdeo AG. (2007) Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. Pharmacognosy Reviews 1(1), 69-79.
- 222) Nešković M., Konjević R., Čulafić LJ. (2003) Fiziologija biljaka, NNK - International, Beograd.
- 223) Nguefack J., Budde BB., Jakobsen M. (2004) Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmatic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. Lett. Appl. Microbiol., 29, 395-400.
- 224) Nikolić V., Sigunov A., Diklić N. (1986): Dopuna flori SR Srbije novim podacima o rasprostranjenju biljnih vrsta. In: Sarić, M., Diklić, N. (eds.). Flora SR Srbije. 10: 259-336. - Srpska Akademija Nauka i Umetnosti. Beograd.
- 225) Nogueira JM., Romano A. (2002) Essential oils from micropropagated plants of *Lavandula viridis*. Phytochemical Analysis. 13(1), 4-7.
- 226) Nordine A., Bousta D., El Khanchoufi A., El Meskaoui A. (2013) An efficient and rapid *in vitro* propagation system of *Thymus hyemalis* Lange, a wild medicinal and aromatic plant of Mediterranean region. International Journal of Pharma Bioscience and Technology 1,118–129.
- 227) Nordine A., Hmamouchi M., El Meskaoui A. (2014) *In Vitro* clonal propagation through direct shoot organogenesis Of *Thymus Broussonetii* – A vulnerable aromatic and medicinal plant species. International Journal Of Pharmaceutical Research And Bio-Science3(1), 425-439.
- 228) Nordine A., Tlemcani C R. ELM Abdelmalek. (2013) Micropropagation of *Thymus satureioides* Coss. an endangered medicinal plant of Morocco Journal of Agricultural Technology 9(2), 487-501.
- 229) Oeztuerk M., Kolak U., Topcu G., Oeksuez S., Choudhary M.I. (2011) Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation. Food Chemistry. 126, 31–38.

- 230) Okoh OO., Sedimenko AP., Afolayan AJ. (2010) Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. Food Chemistry. 120, 308-312.
- 231) Oksman-Caldentey KM., Inze D. (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends in Plant Science.,9(9), 433-40.
- 232) Otrushy M., Moradi K., (2011) Micropropagation of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi* Boiss. via nodal cutting technique, Journal of Medicinal Plants Research 5(25), 5967-5972.
- 233) Ozkan G., Sagdic O., Ozcan M. (2003) Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. Food Science and Technology International 9(2), 85-88.
- 234) Ozkan M. (1999) Antifungal effects of *Micromeria myrtifolia* Boiss. & Hohen. in Boiss. and *Prangos uechtritzii* Boiss. Hawsskn Decoctions. Acta Alimentaria, 28(4), 355-360.
- 235) Özkum D.(2007) *In Vitro* Shoot Regeneration of Oregano (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz & Davis), Hacettepe journal of biology and chemistry 35 (2), 97-100.
- 236) Ozudogru EA., Kaya E., Kirdok E. Issever-Ozturk S. (2011) *In vitro* propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 47, 309–320.
- 237) Palić I., Ursić-Janković J., Stojanović G. (2010) Essential Oil Composition of Three Balkan *Micromeria* Species. Journal of Essential Oil Research 22(1) 40-44.
- 238) Panovska TK., Kulevanova S. (2010) Evaluation of antioxidant capacity of *Micromeria cristata* extracts. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 9 (3), 627-635.
- 239) Paunescu A. (2009) Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview. Rom. Biotechnol. Lett., 14 (1), 4095-4103.

- 240) Payne WW. (1978) A glossary of plant hair terminology. *Brittonia*, 30, 239–255.
- 241) Pedro LG., Figueiredo C., Barroso JG., Fontinha SS., Looman A., Scheffer JJC. (2006) Composition of the essential oil of *Micromeria varia* Benth. ssp. *thymoides* (Sol. ex Lowe) Pérez var. *thymoides*, an endemic species of the madeira archipelago. *Flavour and Fragrance Journal* 10 (3), 199–202.
- 242) Perron NR., Brumaghim JL. (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53(2), 75-100.
- 243) Pospíšilová J., Synková H. Rulcova J.(2000) Cytokinins and water stress, *Biologia plantarum* 43 (3), 321-328.
- 244) Pospisilova J., Ticha I., Kadlecěk P., Haisel D., Plzakova S. (1999) Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 4 (4) 481-497.
- 245) Poyh JA., Ono EO. (2006) Rendimento do óleo essencial de *Salvia officinalis* L. sob ação de reguladores vegetais. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 28(3), 189-193.
- 246) Praveena R., Amarnath Pandian S. Jegadeesan M. (2012) *In Vitro* Culture Studies on Medicinal Herb - *Coleus forskohlii* Briq. *Libyan Agriculture Research Center Journal International* 3 (1), 30-35.
- 247) Prins CL., Vieira I JC., SP. Freitas SP.(2010) Growth regulators and essential oil production *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(2), 91-102.
- 248) Radulović NS., Blagojević PD.(2012) Volatile secondary metabolites of *Micromeria dalmatica* Benth. (Lamiaceae): bio-synthetical and chemotaxonomical aspects. *Chemistry and Biodiversity*, 9(7), 1303-19.
- 249) Rahman MM., Ankhi UR., A. Biswas A.(2013) Micropropagation of *Mentha viridis* L.: An aromatic medicinal plant *International journal of pharmacy and life sciences* 4(9), 2926-2930.
- 250) Raja HD., Arockiasamy DI. (2008) *In vitro* Propagation of *Mentha viridis* L. from Nodal and Shoot tip Explants, *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 18(1), 1-6.

- 251) Ramachandra Rao S., Ravishankar GA. (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20, 101–153.
- 252) Ramak P., Sharifi M., Osaloo S K., Ebrahimzadeh H., Behmanesh M. (2011) Studies on seed germination and *in vitro* shoot multiplication of *Satureja khuzistanica* Jamzad, an important medicinal plant. *African Journal of Biotechnology* 10(83), 19407-19414.
- 253) Rani G., Talwar D., Nagpal A., Virk G. (2006) Micropropagation of *Coleus blumei* from nodal segments and shoot tips. *Biologia Plantarum*, 50, 496-500.
- 254) Ratledge C., Wilkinson SG. (1988) An overview of microbial lipids. In: Ratledge C., Wilkinson SG. (Eds.). *Microbial lipids*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 3–22.
- 255) Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-7.
- 256) Reed BM., Sarasan V., Kane M., Bunn E., Pence VC. (2011) Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 47, 1–4.
- 257) Ribera AE., Zuniga G. (2012) Induced plant secondary metabolites for phytopathogenic fungicidal control: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 12, 893-911.
- 258) Robbins, R.J. (2003) Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866-2887.
- 259) Roberts SC. (2007) Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology*, 3, 387–395.
- 260) Rothe G., Hachiya A., Yamada Y., Hashimoto T., Dräger B. (2003) Alkaloids in plants and roots cultures of *Atropa belladonna* overexpressing putrescine N-methyltransferase. *Journal of Experimental Botany*, 54, 2065-2070.
- 261) Ružička L., Eschenmoser A., Heusser H. (1953), The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9, 357-396.

- 262) Saha S., Dey T., Ghosh PD. (2010) "Micropropagation of *Ocimum Kilimandscharicum* Guerke (Labiatae)," *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 52(2), 50-58.
- 263) Saha S., Kader A., Sengupta C., Ghosh P. (2012) *In Vitro* Propagation of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) and Its Evaluation of Genetic Fidelity Using RAPD Marker. *American Journal of Plant Sciences*, 3, 64-74.
- 264) Salehi P., Sonboli A., Asghari B. (2007) Chemical composition of the essential oil of *Stachys acerosa* and its antibacterial and antioxidant activities. *Chemistry of Natural Compounds*. 43, 339-41.
- 265) Šamec D. (2013) Fitokemijska i genetska istraživanja endemičnih vrsta *Teucrium arduini*, *Moltkia petraea*, *Micromeria croatica* i *Rhamnus intermedia*. Doktorski rad, Zagreb 2013.
- 266) Šamec D., Gruz J., Durgo K., Kremer D., Kosalec I., Valek Žulj L., Martinez S., Salopek-Sondi B., Piljac-Žegarac J. (2015): Molecular and cellular approach in the study of antioxidant/pro-oxidant properties of *Micromeria croatica* (Pers.) Schott, *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, DOI: 10.1080/14786419.2014.999334
- 267) Šamec D., Kremer D., Gruz J., Žegarac PJ. (2011) Free phenolic acids in *Micromeria croatica* (Pers.) Schott measured by UPLC-MS/MS. 12th International school of ion chromatography. Book of abstract /Ukić, Š. Bolanča T.-Zagreb 34.
- 268) Sanches-Gras MC., Calvo M C.(1996) Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. *Plant Cell Tissue and Organ Cultura*. 45, 259-261.
- 269) Sangwan NS., Farooqi AHA., Shabih F., Sangwan RS. (2001) Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul* 34, 3-21.
- 270) Santoro MV., Nievas F., Zygadlo J., Giordano W., Banchio E. (2013) Effects of growth regulators on biomass and the production of secondary metabolites in peppermint (*Mentha piperita*) micropropagated *in vitro*. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 49-55.

- 271) Santos-Gomes PC., Seabra RM., Andrade PB., Fernandes-Ferreira M. (2002) Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L). Plant Science, 62, 981-987.
- 272) Sarac N., Ugur A., 2007 (2007) Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla Turkey. EurAsia J. BioSci, 4, 28-37.
- 273) Sartoratto A., Machado ALM., Delarmelina C., Figuerira GM. Duarte MCT., Rehder VL. (2004) Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 35, 275-280.
- 274) Sauerwein M., Yoshimatsu K., Shimomura K. (1992) Further approaches in the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. Plant tissue culture letters, 9(1), 1-9.
- 275) Scravoni, J., Vasconcellos MC., Valmorbida J., Ferri AF., Marques MOM., Ono EO., Rodrigues JD. (2006) Rendimento e composicao química do óleo essencial de *Mentha piperita* L. submetida a aplicacoes de giberelina e citocinina. Rev. Bras. Pl. Med., 8, 40-43.
- 276) Sefidkon F., Kalvandi R. (2005) Chemical composition of the essential oil of *Micromeria persica* Boiss. from Iran. Flavour and Fragrance Journal 20(5), 539–541. DOI: 10.1002/ffj.1467
- 277) Shabnum S., Wagay MG. (2011) Micropropagation of Different Species of *Thymus*, Journal of Research & Development, 11, 71- 80.
- 278) Shakeri SM., Kazemitabar SK., Jafar Masoud Sinaki. (2013) *In vitro* culture of *Melissa officinalis* without the use of hormones, International Journal of Agriculture and Crop Sciences-Intl J Agri Crop Sci. 6(20), 1382-1387.
- 279) Sharma DK., Sharma T. (2013) Biotechnological approaches for biodiversity conservation. Indian J.Sci.Res. 4(1), 183-186.
- 280) Shukla YN. and Farooqi AH.(1990) Utilization of Plant Growth Regulators in Aromatic Plant Production, Medicinal & Aromatic Plants, 12 (3), 152- 157.

- 281) Siahisar B., Rahimi M., Tavassoli A., Raissi AS. (2011) Application of Biotechnology in Production of Medicinal Plants. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 11 (3), 439-444.
- 282) Siddique I., and Anis M. (2008), An improved plant regeneration system and ex vitro acclimatization of *Ocimum basilicum* L. *Acta Physiol Plant* 30,493–499.
- 283) Šilić, Č. (1979) Monografija rodova *Satureja* L., *Calamintha* Miller, *Micromeria* Benth, *Acinos* Miller i *Clinopodium* L. u flori Jugoslavije, Zemaljski Muzej BiH, Sarajevo. 440p
- 284) Šilić, Č. (1990) Endemic plants (In Croatian). IP Svjetlost, Sarajevo.
- 285) Simonović A. (2011), Biotehnologija i genetičko inženjerstvo biljaka. NNK, Beograd.
- 286) Slavkovska V., Couladis M., Bojovic S., Tzakou O., Pavlovic M., Lakusic B., Jancic R. (2005) Essential oil and its systematic significance in species of *Micromeria* Benth from Serbia & Montenegro. *Pl. Syst. Evol.* 255,1–15.
- 287) Slavkovska V., Zlatković B., Bräuchler C., Stojanović D., Tzakou O., Couladis M. (2013) Variations of essential oil characteristics of *Clinopodium pulegium* (Lamiaceae) depending on phenological stage, *Botanica Serbica* 37 (2), 97-104.
- 288) Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. (2004) Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and α -toxin by *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 53, 1023-1027.
- 289) Sorokin H., Thiamann KV. (1964) The histological basis for inhibition of axillary buds in *Pisum sativum* and the effects of auxins and kinetin on xylem development. *Protoplasma*, 59, 326-350.
- 290) Stahl-Biskup E., Saéz F. (2002) Thyme: the genus *Thymus*, medicinal and aromatic plant-industrial profiles, Taylor & Francis, London, 331.
- 291) Stevanović V., Jovanović S., Lakušić D., Niketić, M., Tomović G., Vukojičić S., Sabovljević M. (2002): Preliminarna crvena lista vaskularne flore Srbije i Crne Gore prema kriterijumima IUCN-a iz 2001. godine. - Biološki

fakultet Univerziteta u Beogradu, Katedra za ekologiju i geografiju biljaka, Beograd. (manuscript).

- 292) Stevens JF., Reed RL., Morr JT. (2008) Characterization of phytoecdysteroid glycosides in meadowfoam (*Limnanthes alba*) seed meal by positive and negative ion LC-MS/MS, E, J. Agric. Food Chem. 56, 3945–3952.
14 croatica
- 293) Stojanović G., Palić I. (2008) Antimicrobial and antioxidant activity of *Micromeria* Bentham species. Curr. Pharm. Des. 14, 3196-3202.
- 294) Stojanović G., Palic I., Ursic-Jankovic J. (2006) Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Micromeria cristata* and *Micromeria juliana*. Flav. Fragr. J., 21, 77–79.
- 295) Stojković LjK., Pavlović S., Živanović P., Todorović B. (1987) Uppedna proučavanja sastava etarskog ulja populacija vrse *Micromeria dalmatica* Bentham sa planine Orjen, Zbornik rezimea, Savezno savjetovanje o ljekovitom bilju, Risan .
- 296) Strack D., Phenolic metabolism, in: Plant Biochemistry, Dey, P. M., Harborne, J. B. (Eds.), Academic Press, New York, 1997, 387-437.
- 297) Sudria C., Palazon J., Cusido R., Bonfill M., Pinol MT., Morales C., (2004) Effect of benzyladenine and indolebutyric acid on ultrastructure, glands formation, and essential oil accumulation in *Lavandula dentata* plantlets. Physiol. Plant, 44, 1-6.
- 298) Sudria C., Piñol MT., Palazon J., Cusido RM., Vila R, Morales C., Bonfill M., Cañigüeral S. (1999) Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58, 177–184.
- 299) Sunadakumari C., Martin KP., Chithra M., Sini S., Madhusoodanan PV. (2004) Rapid axillary bud proliferation and ex vitro rooting of herbal spice, *Mentha piperita* L., Indian Journal of Biotechnology, 3, 108-112.
- 300) Suresh C. and Ajay KS.(2004) “*In Vitro* Shoot Regeneration from Cotyledonary Node Explants of a Multipurpose Leguminous Tree, *Pterocarpus marsupium* Roxb,” *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, 40 (2), 167-170.

- 301) Surveswaran S., Cai, YZ., Corke H., Sun M. (2007) Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102, 938–953.
- 302) Sutthanut K., Sripanidlkuchai B., Yenjai C., Jay M. (2007) Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *J Chromatogr A* 1143(1-2), 227–233. 18.
- 303) Tabanca N., Kirimer N., Demirci B., Demirci F., Baser KHC. (2001) Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the Enantiomeric Distribution of Borneol. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4300-4303.
- 304) Taherehghanbari, Bahmanhosseini, Jabbarzadeh Z. (2012) Improving *Salvia sclarea* L. Seed Germination Under *In Vitro* Condition. *International Journal of Agriculture: Research and Review*. 2 (S), 1051-1058.
- 305) Tahir NI., Shaari K., Abas F., Parveez GK., Ishak Z., Ramli US. (2012) Characterization of Apigenin and Luteolin Derivatives from Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Leaf Using LC–ESI-MS/MS. *J Agric Food Chem* 60(45), 11201-11210. 19.
- 306) Takahashi D., Fujita Y. (1991) In *Plant Cell Culture in Japan*, (Komamine, A., Misawa, M. and DiCosmo, F., editors), pp. 72-78. *Cosmetic materials*.
- 307) Takahashi, Y., Inaba, N., Kuwahara, S., Kuki, W. (2003) Antioxidative effect of citrus essential oil components on human low-density lipoprotein *in vitro*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(1), 195-197.
- 308) Takhtajan A. (2009): *Flowering Plants*, 2nd edn. – Springer Science & Business Media B.V., Dordrecht.
- 309) Tang DS., Hamayun M., Ko YM., Zhang YP., Kang SM., Lee IJ. (2008) Role of Red Light, Temperature, Stratification and Nitrogen in Breaking Seed Dormancy of *Chenopodium album* L. *J. Crop Sci.* 11(3), 199-204.
- 310) Tavers AC., Pimenta MC., Goncalves MT. (1996) Micropropagation of *Melissa officinalis* through proliferation of axillary shoots, *Plant Cell Rep*, 15, 441.

- 311) Tejavathi DH. and Indira MN. (2011) *In vitro* regeneration of multiple shoots from the nodal explants of *Drymaria cordata* (L.) Wild. Ex. Roem. and Schult. The Bioscan 6(4), 657-660.
- 312) Tejavathi DH., Padma AV.(2012) *In Vitro* Multiplication Of *Majorana hortensis* Moench – An Aromatic Medicinal Herb, Indian Journal of Plant Sciences, 1 (1), 48-56.
- 313) Telci I., Ceylan M. (2007) Essential oil composition of *Micromeria fruticosa* druce from Turkey, Chemistry of Natural Compounds. 43(5), 629-631.
- 314) Thirugnanasampandan R., Mahendran G., Narmatha Bai V. (2009) High frequency *in vitro* propagation of *Isodon wightii* (Benth) H. Hara. Acta Physiol Plant 32:405-409.
- 315) Thorpe T. (2007) History of plant tissue culture. J. Mol. Microbial Biotechnol. 37, 169-180.
- 316) Tomás-Barberán FA., Gil MI. (1992) Chemistry and natural distribution of flavonoids in the Labiatae. In: Harley, R.M., Reynolds, T. (Eds.), Advances in Labiate Science. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 299-305.
- 317) Tomás-Barberán, F.A., Husain, S.Z., Gil, M.I. (1988) The distribution of methylated flavones in the Lamiaceae. Biochem. Syst. Ecol. 16: 43-46.
- 318) Tošić S., Stojičić D., Stankov-Jovanović V., Mitić V., Mihajilov_Krste V., Zlatković B. (2015) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of micropropagated and native *Micromeria pulegium* (Lamiaceae) extracts. Oxidation communications 38(1), 55-66.
- 319) Tosun M., Ercisli S., Sengul M., Ozer H., Pola T., Ozturk E. (2009) Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Eight *Salvia* Species from Turkey. Biol Res 42, 175-181.
- 320) Tucker AO., Maciarello MJ., McCrory D.(1992) The Essential Oil of *Micromeria brownei* (Swartz) Benth. var. *pilosiuscula* Gray. Journal of Essential Oil Research 4 (3), 301-302.
- 321) Tzakou O., Couladis M. (2001) The essential oil of *Micromeria graeca* (L.) Benth et Reichenb. growing in Greece. Flavour and fragrance journal 16 (2), 107-109.

- 322) Ulbrich B., Weisner W., Arens H. (1985) In Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures, (Neumann, K.H. and Reinhard, E., editors), Springer-Verlag (Berlin), pp. 293-303.
- 323) Vaara M. (1992) Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol. Rev., 56(3), 395– 411.
- 324) van Huylenbroeck JM. Debergh PC. (1996) Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during ex vitro acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. Physiol. Plant. 96, 298-304.
- 325) van Staden E., Zazimalova E., George EF.(2008) Plant growth regulators II:cytokinins, their analogues and antagonists. In: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.-J. (Eds.), Plant Propagation by Tissue Culture, vol.1, 3rd ed. Springer, Bachground, Dordrecht, Netherlands, 205–226.
- 326) Verpoorte R., Contin A., Memelink J. (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. Phytochem Rev., 1, 13–25.
- 327) Vijaya Sree N., Udayasri PVV., Aswani Kumar Y., Ravi Babu B., Phani Kumar Y., Vijay Varma M. (2010) Advancements in the Production of Secondary Metabolites, Journal of Natural Products Volume 3, 112-123.
- 328) Vinterhalter B., Jankovic T., Sovikin L., Nikolic R., Vinterhalter D. (2008) Propagation and xanthone content of *Gentianella austriaca* shoot cultures. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 94, 329-335.
- 329) Vinterhalter D., Vinterhalter B. (1996) Kultura *in vitro* i mikropropagacija biljaka, Axial P.O., Beograd
- 330) Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Bival Štefan M., Alegro A., Kőszegy T., Petrik J. (2011) Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected *Micromeria* species from Croatia. Molecules, 16, 1454-1470.
- 331) Vladimir-Knežević S., Kalodera S., Blažević N. (2000) Comosition of the essential oil of *Micromeria thymifolia* (Scop.) fritsh and its chemical variation. Pharmazie. 55, 156-157.
- 332) Vladimir-Knežević S., Kalodera Z., Jurišić R. (2000) Biologically active compounds of *Micromeria* species. Farm Glas. 56, 301-312.
- 333) Wagner GJ. (1991) Secreting Glandular Trichomes: More than Just Hairs. Plant Physiol. 96, 675-679.

- 334) Wagner, K.H., Elmadfa, I. (2003) Biological relevance of terpenoids overview focusing on mono-, di and tetraterpenes. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 47, 95-106.
- 335) Wang QW., Yu DH., Lin MG., Zhao M., Zhu WJ., Lu Q., Li GX., Wang C., Yang YF., Qin XM., Fang C., Chen HZ., Yang GH. (2012) Antiangiogenic Polyketides from *Peperomia dindygulensis* Miq. *Molecules* 17:4474-4483. 26.
- 336) Werker E. (2000) Trichome diversity and development. In: *Advances in Botanical Research*, Vol. 31, eds. Hallahan D L and Gray J C, pp. 37-75, (Academic Press, San Diego).
- 337) Werker E., Ravid U., Putievsky E.(1985) Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of *Labiatae*. *Izrael journal of Botany*, 34, 31-45.
- 338) Werker, E. (1993) Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae. *Flavor Fragr. J.* 8: 249–255.
- 339) Whitmer S., Van der Heijden R., Verpoorte R. (2002) In *Plant Biotechnology and Transgenic Plants* Oksman-Caldentey, K. M.; Barz W.H., Eds.; Marcel & Dekker: New York-Basel; pp. 373-405.
- 340) Wilson SA., Roberts SC. (2012) Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnol J.*, 10(3), 249–268.
- 341) Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A. (2001) Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application of major families of antioxidants. *J Am Chem Soc.* 123(6), 1173-1183.
- 342) Xiang CL., Dong ZH., Peng H., and Liu ZW. (2010) Trichome micromorphology of the east asiatic genus *Chelonopsis* (Lamiaceae) and its systematic implications. *Flora* 205, 434– 441.
- 343) Yan Q., Shi M., Ng J., Wu JY. (2006) Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Sci.*, 170, 853–858.

- 344) Zerbe P., Bohlmann J. (2015), Plant diterpene synthases: exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering. Trends in biotechnology 33(7), 419-428.
- 345) Zhang JY., Li N., Chea YY., ZHANG Y., Liang SX., Zhao MB., Jiang Y., TU PF. (2011) Characterization of seventy polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the Leaves of *Murraya paniculata* by on-line High-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal, 56, 950-961. 15.
- 346) Zielinska S., Piatczak E., Kalembe D., Matkowski A. (2011) Influence of plant growth regulators on volatiles produced by *in vitro* grown shoots of *Agastache rugosa* (Fischer & C.A.Meyer) O. Kuntze, Plant Cell Tiss Organ Cult 107, 161–167.
- 347) Zlatev S., Iliev L., Zlatev M. and Vasiliv G. (1978) Effect of some cytokinin on first material and essential oil yields in peppermint. Raseniev di Nanki. 15, 57–60.
- 348) Zuzarte M R., Dinis A M., Cavaleirob C., Salgueirob LR., Canhotoa JM. (2010) Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae), Industrial Crops and Products 32 ,580–587.
- 349) Zwenger S., Basu C. (2008) Plant terpenoids: applications and future potentials. Biotechnology and Molecular Biology Reviews 3(1), 001-007.

BIOGRAFIJA AUTORA

Svetlana M. Tošić rođena je 11.09.1969, godine u Aleksincu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je na odseku Molekularna biologija i fiziologija, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, 1996. godine sa prosečnom ocenom 9,28. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu u okviru studijskog programa Eksperimentalna i primenjena botanika, smer - Fiziologija i molekularna biologija biljaka, upisala je školske 2007/2008. godine. U periodu od oktobra 1997. do marta 2003. godine radila je kao profesor biologije u Gimnaziji "Bora Stanković" u Nišu. Od 2003. godine zaposlena je kao asistent pripravnik u okviru grupe predmeta Katedre za biotehnologiju Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Nišu. Zaposlena je kao asistent na predmetima: Fiziologija biljaka, Kultura biljnih tkiva *in vitro*, Molekularna biologija, Fiziologija stresa kod biljaka i Eksperimentalna biohemija. Tokom dosadašnjeg rada autor je i koautor većeg broja naučnih radova koji su objavljeni u zemlji i inostranstvu. Učestvovala je na nekoliko međunarodnih i nacionalnih naučnih skupova, gde je saopštavala rezultate svojih istraživanja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Светлана М Тошић

број индекса EA070001

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Физиолошки и биохемијски аспекти пропагације ендемичних врста
Micromeria pulegium (Rochel) Benth. и *Micromeria croatica* (Pers.) Schott *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, 31.07.2015.

Светлана Тошић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Светлана М Тошић

Број индекса EA070001

Студијски програм Експериментална и примењена ботаника

Наслов рада Физиолошки и биохемијски аспекти пропагације
ендемичних врста *Micromeria pulegium* (Rochel) Benth. и
Micromeria croatica (Pers.) Schott *in vitro*

Ментор др Драгана Стојичић и др Душица Јаношевић

Потписани/а Светлана М Тошић

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, 31.07.2015.

Светлана Тошић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

"Физиолошки и биохемијски аспекти пропагације ендемичних врста
Micromeria pulegium (Rochel) Benth. и *Micromeria croatica* (Pers.) Schott in vitro"

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 31.07.2015.

Беомира Томић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.