

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Milorad M. Vujičić

**Biohemijski i ekofiziološki odgovori odabranih vrsta  
mahovina na kontrolisani stres izazvan solima u  
akseničnim uslovima**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2016**

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Milorad M. Vujičić

**Biochemical and ecophysiological properties of  
selected moss species during salt stress in the  
axenical conditions**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2016**



**Mentori:**

**dr Aneta Sabovljević**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

.....

**dr Marko Sabovljević**, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

.....

**Članovi komisije:**

**dr Danijela Mišić**, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

.....

**dr Snežana Milošević**, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”

.....

**Datum odbrane:**

*Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je na Biološkom fakultetu, Instituta za botaniku i Botaničkoj bašti „Jevremovac“, kao i u Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u okviru projekta osnovnih istraživanja „Fiziološka, hemijska i molekularna analiza diverziteta retkih i ugroženih biljnih vrsta u cilju ex situ zaštite i produkcije biološki aktivnih jedinjenja“, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (ON173024).*

*Veliku zahvalnost dugujem svojim mentorima prof. dr Aneti Sabovljević i prof. dr Marku Sabovljević, na nesebičnoj pomoći u dizajniranju eksperimenata, tumačenju rezultata, uloženom trudu i vremenu, idejama koje su mi davali tokom izrade teze, smernicama i prenešenom znanju. Veliko HVALA za podršku koju mi pružate u mojim nastojanjima da se bavim fiziologijom briofita i što ste verovali i verujete u mene. Posebno hvala što ste bili uz mene kada mi je bilo najpotrebnije.*

*Dr Snežani Milošević na pomoći oko realizacije eksperimenata iz oblasti antioksidativnih enzima i prolina, kao i pomoći u tumačenju dobijenih rezultata, strpljenju i velikoj podršci svih ovih godine zajedničkog rada i druženja.*

*Dr Danijeli Mišić, koja mi je omogućila da u okviru projekta 173024 kojim rukovodi odradim veliki deo eksperimenata za svoju doktorsku disertaciju i pomoći oko realizacije eksperimenata iz oblasti fenolnih jedinjenja.*

*Dr Vuku Maksimoviću, na angažovanju u realizaciji eksperimenata iz oblasti analize šećera, korišćenjem HPLC metode.*

*Koleginici prof. dr Jasmini Šinžar Sekulić na statističkoj analizi određenih delova doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem dr Heleni Šircelj sa Biotehničkog fakulteta Univerziteta u Ljubljani, koja mi je uradila deo biohemijskih analiza koje su upotpunile ovu doktorsku disertaciju.*

*Svim članovima grupe za biologiju briofita, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (Jeleni Stanković, Vesni Nerić, Mariji Rajčić, Mariji Ćosić, Jovani Pantović, Neveni Petrović i Nadi Nikolić), na pozitivnoj atmosferi i kolegijalnoj i drugarskoj pomoći. Kolegi i drugu Waisi Hadiju na pozitivnoj energiji, druženju i pomoći.*

*Dragim kolegama dr Jeleni Milojević i dr Martinu Rasporu na učenju i velikoj pomoći oko statističkih analiza koje su učinile ovu doktorsku disertaciju kvalitetnijom. Koleginici dr Mariji Petrić na pomoći oko savladavanja programskog paketa Image.*

*Veliko hvala svim kolegama sa Katedre za fiziologiju biljaka na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, kao i svim meni dragim kolegama sa odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”.*

*Izuzetnu zahvalnost dugujem svom bivšem šefu projekta dr Dragoljubu Grubišiću, koji me je primio na projekat u okviru kog sam započeo svoja prva istraživanja za diplomski rad, a kasnije i doktorsku disertaciju.*

*Hvala svim mojim prijateljima koji su me bodrili i bili uz mene sve ove godine.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem ujacima Radomiru i Branislavu na podršci, kao i baba Nadi koja je uvek imala strpljenja da mi pomogne, obraduje i nasmeje.*

*Svojoj porodici koja je uvek bila uz mene i bodrila me da istrajem do kraja. Hvala vam što ste verovali i što ste mi pomagali sve ove godine. Marti i Magdalen i na moru pozitivne energije i lepim trenucima.*

## **Biohemijski i ekofiziološki odgovori odabranih vrsta mahovina na kontrolisani stres izazvan solima u akseničnim uslovima**

### **SAŽETAK**

Stres soli je, pored suše, jedan od najznačajnijih abiotičkih faktora koji ograničava produktivnost biljaka, a utiče negativno i na čitave ekosisteme. Iz dostupnih literaturnih podataka i istraživanja uočava se da je reakcija briofita na soli specifična i da ne postoji jedan opšti mehanizam po kome se ponašaju čak i evolutivno vrlo srodne vrste briofita. S obzirom da su mahovine sesilni organizmi, njihov opstanak u uslovima stresa zavisi od brze percepcije signala iz okruženja i efikasnog odgovora na njih. Prilikom percepcije i prenosa signala dolazi i do generisanja sekundarnih signala, kao što su reaktivne kiseonične vrste i unutarćelijski sekundarni glasnici (fosfolipidi i šećeri).

Prve faze istraživanja odnosile su se na ispitivanje uticaja apscisinske kiseline na morfogenezu odabranih vrsta mahovina. Apscisinska kiselina predstavlja jedan od najznačajnijih hormona u odbrani biljaka od stresa. Predtretman apscisinskom kiselinom može u znatnoj meri da pripremi biljke za abiotički stres (dehidratacija, stres solima).

U drugoj fazi istraživanja odabrane su dve vrste mahovina *Entosthodon hungaricus* i *Hennediella heimii* i uvedene su u kulturu *in vitro*. Nakon uspostavljanja *in vitro* kultura mahovina *E. hungaricus* i *H. heimii*, praćen je uticaj auksina (IBA) i citokinina (BP) na razviće pupoljaka i sekundarne protoneme.

Potom je kod vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* praćen efekat natrijum hlorida (NaCl) na preživljavanje i mehanizme odbrane od stresa solima, kao i kod vrste *Physcomitrella patens* koja služi kao model organizam u fiziologiji i molekularnoj biologiji briofita. Biljke su stresu solima izlagane tri dana i tri nedelje, u uslovima dugog dana (16h dan/8h mrak). Nakon tri dana i tri nedelje izmereni su parametri morfogeneze (preživljavanje, indeks multiplikacije, prečnik protoneme). Takođe je analiziran sadržaj pojedinih grupa jedinjenja (fotosintetički pigmenti, tokoferol, šećeri, fenoli, slobodne amino kiseline i prolin).

Stres solima je doveo do smanjenja indeksa multiplikacije i procenta preživljavanja kod svih ispitivanih vrsta. Najveći uticaj egzogeno dodatog NaCl se uočava na indeks multiplikacije i na prečnik sekundarne protoneme, koji značajno opadaju na koncentracijama soli većim od 100mM NaCl. Izlaganjem biljaka većim koncentracijama soli dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih hlorofila. Promene u količini karotenoida variraju u zavisnosti da li su biljke izložene kratkotrajnom ili dugotrajnom stresu solima. Smanjenje

koncentracije fotosintetičkih pigmenata tokom stresa govori o negativnom uticaju soli na proces fotosinteze. Količina  $\beta$  karotena je veća u odnosu na količinu  $\alpha$  karotena kod svih ispitivanih vrsta, bilo da su izlagane kratkotrajnom ili dugotrajnom stresu solima. Detektovane su najveće količine luteina od svih ispitivanih ksantofila kod oba tretmana i kod svih ispitivanih biljaka.

Rezultati dobijeni za količinu i sastav fenolnih jedinjenja, daju opšti zaključak da vrsta *P. patens* produkuje veću količinu fenolnih jedinjenja u odnosu na druge dve ispitivane vrste, kako u kratkotrajnom tako i tokom dugotrajnog stresa solima. Dominantno fenolno jedinjenje jeste p-kumarna kiselina. Merenjem sadržaja i količine šećera HPLC metodom, pokazano je da su kod sve tri ispitivane vrste dominantni šećeri glukoza, fruktoza i saharoza na svim tretmanima i da se znatno veća količina šećera javlja kod biljaka koje su izlagane stresu solima u trajanju tri nedelje u odnosu na biljke koje su gajene na medijumu sa solima tokom tri dana.

Kao bitna komponenta antioksidativne zaštite od osmotskog stresa, određivana je koncentracija prolina i slobodnih amino kiselina. Prolini kod sve tri ispitivane vrste imaju bitnu ulogu u osmotskom prilagođavanju ćelije jer se sintetišu u velikoj količini i na taj način stabilizuju ćeliju.

Praćena je aktivnost enzima i elektroforetska detekcija izoformi enzima koji su uključeni u antioksidativnu zaštitu (peroksidaze, katalaze i superokid dismutaze). Aktivnost enzima varira i kod biljaka izlaganih kratkotrajnom stresu zavisi od vrste, a kod biljaka izlaganih stresu solima tokom tri nedelje enzimska aktivnost zavisi od koncentracije soli u podlozi. Broj i aktivnost izoformi svih enzima je specifična za datu vrstu.

Aktivnost enzima SOD je različita kod vrste *P. patens* u odnosu na druge dve ispitivane vrste. Kod *P. patens* aktivnost SOD opada porastom koncentracije soli pri dugotrajnom stresu, dok kod vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* aktivnost SOD raste povećanjem koncentracija soli. Katalazna aktivnost pri dugotrajnom stresu ima sličan trend za sve tri ispitivane vrste, gde vrednost aktivnosti CAT raste do 100mM NaCl, dok na višim koncentracijama soli opada. Peroksidazna aktivnost prilikom kratkotrajnog stresa ima trend rasta, dok pri dugotrajnom stresu dolazi do pada aktivnosti povećanjem koncentracije soli.

Na osnovu svih obrađenih rezultata može se zaključiti da ispitivane vrste poseduje veoma specifične mehanizme koji im omogućavaju uspešno preživljavanje na zaslanjenim staništima. U cilju rasvetljavanja ovih mehanizama potrebna su i dalja istraživanja, pre svega analiza endogenih hormona, kao i ekspresija odabranih gena koji su ključni u adaptaciji ovih vrsta na povećane koncentracije soli u podlozi.

**Ključne reči: briofite, morfogeneza, stres solima, halofite, NaCl, antioksidativna zaštita**

**Naučna oblast: Biologija**

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

**UDK broj: [582.32:581.151]:57.084 (043.3)**

## **Biochemical and ecophysiological properties of selected moss species during salt stress in the axenical conditions**

### **ABSTRACT**

Salt stress is, among drought, one of the most important abiotic factors that limits plant productivity and has negative effect on the ecosystems. Available literature data and investigations show that bryophyte reaction to salt stress is specific. Even the evolutionary related species of bryophytes have no general mechanism for behavior under these conditions. Since mosses are sessile organisms, their survival in stress conditions, depends on fast signal perception from the environment and efficient response to them. During the perception and signal transduction, the generation of secondary signals such as reactive oxygen species and intracellular secondary messengers (phospholipids and sugars) happens.

The first phase of investigation was related to examination of the effect of abscisic acid (ABA) on morphogenesis of selected moss species. ABA is one of the most important hormones in protecting plants from stress. Pretreatment with ABA can significantly prepare plant for abiotic stress conditions (dehydration, salt stress).

In the second phase of research, two species were chosen, namely halophytic mosses *Entosthodon hungaricus* and *Hennediella heimii* for the salt tolerance tests. After establishment of *E. hungaricus* and *H. heimii* *in vitro* cultures, the effects of auxin (IBA) and cytokinin (BP) on buds development and secondary protonema were observed.

Species *Physcomitrella patens*, which is a model organism in physiology and molecular biology of plants, as well as *E. hungaricus* and *H. heimii*, were used for investigation the effect of NaCl on survival and mechanisms of defense to salt stress. Plants were exposed to salt stress for three days and three weeks, during long day conditions (16h day/8h dark). After three days and three weeks, parameters of morphogenesis were documented (survival, index of multiplication, protonemal diameter). Content of some group of compounds were also measured (photosynthetic pigments, tocopherol, sugars, phenols, free amino acids and proline).

Salt stress led to decrease of index of multiplication and survival percent in all tested species. Exogenously added NaCl has the greatest impact on index of multiplication and diameter of secondary protonema, which significantly decrease at NaCl concentrations higher

than 100mM. With exposure of the test mosses to higher concentrations of salt, the concentration decrease of the total chlorophylls was observed. The amount of carotenoids varied in relation to duration of short- or long-term salt stress. The decrease of photosynthetic pigments during stress showed that salt had negative impact on photosynthesis. The amount of  $\beta$  carotene was higher than  $\alpha$  carotene in all examined species, whether they were exposed to short- or long-term salt stress. Among analyzed xanthophylls, the greatest amount of lutein was detected in both treatments and all examined plants.

The results of amount and composition of phenolic compounds, gave general conclusion that species *P. patens* produced greater amount of phenolic compounds than two other examined species, both in short- or long-term salt stress. Dominant phenolic compound is p-coumaric acid. Measuring the content and the amount of sugars by HPLC method, it was shown that dominant sugars were glucose, fructose and sucrose in all three examined species, in all treatments and that significantly greater amount of sugar was detected in plants that were exposed to salt stress for three weeks, in comparison to short-term exposure.

As a very important part of antioxydative protection of osmotic stress, the concentration of proline and free amino acids was determined. Prolines, in all three examined species, had important role in osmotic adjustment of the cell, because those are synthesized in great amount and that is how they stabilize cell.

Activity of enzymes included in antioxydative protection (peroxidase, catalase and superoxide dismutase) was observed as well as electrophoretic detection of enzyme isoforms. Enzyme activity varied in two ways. In plants exposed to short-termed stress, enzyme activity was species-specific, while in plants exposed to long-termed stress, enzyme activity was related to salt concentration in the media applied. Number and activity of isoforms in enzymes, seemed to be species specific.

Activity of superoxide dismutase (SOD) was different in species *P. patens*, comparing to other two examined species. Activity of SOD decreased in *P. patens* with the increase of salt concentration in long-term stress, while it was increasing in *E.hungaricus* and *H.heimii*, under the same conditions. Catalase (CAT) activity in long-term stress had similar trend for all three species. CAT activity increased until 100mM NaCl and on higher concentration decreased. Peroxydase (POX) activity was increasing in short-term stress, while it was decreasing in long-term stress with the increase of salt concentration.

According to results obtained, it can be concluded that examined species have very specific mechanisms which enable them to successfully survive in saline habitats. Further



investigations are needed to clarify these mechanisms, first of all analysis of endogenous hormones, as well as expression of selected genes, which could have the key role in adaptation of these species, in the harsh environment.

Key words: **bryophytes, morphogenesis, salt stress, halophytes, NaCl, antioxidant protection**

**Scientific field:** Biology

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

**UDC number:** [582.32:581.151]:57.084 (043.3)

# SADRŽAJ

## Strana

## SKRAĆENICE

### 1. UVOD

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1. Briofite .....                                                            | 1  |
| 1.1.1. Gradja briofita .....                                                   | 2  |
| 1.2. Ekologija briofita .....                                                  | 6  |
| 1.3. Fiziologija briofita.....                                                 | 8  |
| 1.3.1. Morfogeneza briofita <i>in vitro</i> .....                              | 9  |
| 1.4. Značaj i upotreba briofita .....                                          | 13 |
| 1.5. Fiziologija stresa .....                                                  | 16 |
| 1.5.1. Fiziologija stresa kod vaskularnih biljaka.....                         | 19 |
| 1.5.2. Fiziologija stresa kod briofita.....                                    | 20 |
| 1.6. Stres solima.....                                                         | 22 |
| 1.6.1. Stres solima kod vaskularnih biljaka.....                               | 22 |
| 1.6.2. Stres solima kod briofita.....                                          | 28 |
| 1.7. Oksidativni stres.....                                                    | 33 |
| 1.7.1. Oksidativni stres kod biljaka .....                                     | 34 |
| 1.8. Antioksidativni sistem kod biljaka.....                                   | 38 |
| 1.8.1. Neenzimske komponente odbrane od stresa .....                           | 38 |
| 1.8.2. Enzimske komponente odbrane od stresa .....                             | 45 |
| 1.8.3. Antioksidativni sistem i mehanizmi zaštite od stresa kod briofita ..... | 49 |
| 1.8.4. Uloga apscisinske kiseline u odgovoru briofita na abiotički stres ..... | 50 |

|                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.9. Biologija ispitivanih vrsta .....                                                         | 52        |
| 1.9.1. <i>Physcomitrella patens</i> .....                                                      | 52        |
| 1.9.2. <i>Entostodon hungaricus</i> .....                                                      | 54        |
| 1.9.3. <i>Henediela heimii</i> .....                                                           | 54        |
| <b>2. CILJEVI RADA.....</b>                                                                    | <b>57</b> |
| <b>3. MATERIJAL I METODE.....</b>                                                              | <b>59</b> |
| 3.1. Biljni materijal .....                                                                    | 59        |
| 3.2. Sterilizacija posuđa, instrumenata i hranljivih podloga.....                              | 60        |
| 3.3. Uslovi gajenja kulturain <i>vitro</i> .....                                               | 61        |
| 3.4. Sastav hranljivih podloga.....                                                            | 61        |
| 3.5. Spektrofotometrijska analiza fotosintetičkih pigmenata.....                               | 63        |
| 3.6. Izolacija i kvantifikacija fotosintetičkih pigmenata i tokoferola.....                    | 63        |
| 3.7. Izolacija ukupnih solubilnih proteina.....                                                | 64        |
| 3.8. Biohemijska analiza aktivnosti antioksidativnih enzima kod tretiranih biljaka .....       | 66        |
| 3.8.1. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti solubilnih peroksidaza .....             | 66        |
| 3.8.2. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti solubilnih katalaza .....                | 67        |
| 3.8.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti<br>solubilnih superoksid dismutaza ..... | 68        |
| 3.9. Nativna elektroforeza.....                                                                | 69        |
| 3.9.1. Detekcija aktivnosti pirogalol peroksidaze u gelu .....                                 | 70        |
| 3.9.2. Detekcija aktivnosti katalaza u gelu.....                                               | 70        |
| 3.9.3. Detekcija aktivnosti superoksid dismutaza u gelu .....                                  | 70        |
| 3.10. Spektrofotometrijska kvantifikacija ukupnih prolina.....                                 | 71        |

|                                                                                                                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.10.1. Ekstrakcija solubilnih amino kiselina .....                                                                                                                          | 71        |
| 3.10.2. Određivanje prolina pomoću Ninhidrinske reakcije .....                                                                                                               | 71        |
| 3.11. Analiza fenolnih jedinjenja i određivanje antioksidativnog kapaciteta biljaka.....                                                                                     | 72        |
| 3.11.1. Određivanje količine ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin-Ciocalteu test).....                                                                                         | 72        |
| 3.11.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta biljaka (DPPH test).....                                                                                                     | 73        |
| 3.11.3. UHPLC/-HESI-MS/MS (Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom sa MS/MS masenom spektrofotometrijom) analiza fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima ..... | 73        |
| 3.12. Analiza sadržaja i količine šećera HPLC PAD metodom .....                                                                                                              | 75        |
| 3.13. Statistička obrada podataka.....                                                                                                                                       | 75        |
| <b>4. REZULTATI.....</b>                                                                                                                                                     | <b>77</b> |
| 4.1. Uspostavljanje <i>in vitro</i> kulture vrsta <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> .....                                                                              | 77        |
| 4.2. Uticaj egzogeno dodatih hormona (IBA i BAP) na morfogenezu vrsta <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> .....                                                          | 80        |
| 4.3. Uloga egzogeno dodate apscisinske kiseline (ABA) na morfogenezu i sadržaj pigmenata kod odabranih predstavnika briofita .....                                           | 86        |
| 4.4. Uticaj stresa solima na morfogenezu mahovina <i>P. patens</i> , <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> u uslovima <i>in vitro</i> .....                                | 91        |
| 4.5. Uticaj stresa solima na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata mahovina <i>P. patens</i> , <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> u uslovima <i>in vitro</i> .....    | 95        |
| 4.5.1. Uticaj stresa solima na koncentraciju hlorofila kod biljaka izlaganih stresu solima .....                                                                             | 95        |
| 4.5.2 Uticaj stresa solima na koncentraciju karotena mahovina <i>P. patens</i> , <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> u uslovima <i>in vitro</i> .....                    | 99        |
| 4.5.3. Uticaj stresa solima na koncentraciju ksantofila kod mahovina <i>P. patens</i> , <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> u uslovima <i>in vitro</i> .....             | 103       |
| 4.5.4. Uticaj stresa solima na količinu ukupnih karotenoida u mahovinama <i>P. patens</i> , <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> u uslovima <i>in vitro</i> .....         | 108       |
| 4.6. Uticaj stresa solima na koncentraciju tokoferola u mahovinama <i>P. patens</i> , <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> u uslovima <i>in vitro</i> .....               | 110       |

|                                                                                                                                                                                                          |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.7. Uticaj stresa solima na koncentraciju prolina i slobodnih aminokiselina mahovina <i>P. patens</i> , <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> u uslovima <i>in vitro</i> .....                        | 115        |
| 4.8. Uticaj stresa solima na antioksidativni kapacitet i sadržaj ukupnih fenola mahovina <i>P. patens</i> , <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> u uslovima <i>in vitro</i> .....                     | 118        |
| 4.8.1. Antioksidativna aktivnost ispitivana DPPH metodom.....                                                                                                                                            | 118        |
| 4.8.2. Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja<br>Folin–Ciocalteu-ovom metodom .....                                                                                                                | 120        |
| 4.8.3. UHPLC/-HESI-MS/MS analiza fenolnih<br>jedinjenja u metanolnim ekstraktima .....                                                                                                                   | 121        |
| 4.9. Uticaj stresa solima na koncentraciju šećera mahovina <i>P. patens</i> , <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> u uslovima <i>in vitro</i> .....                                                   | 132        |
| 4.10. Antioksidativni enzimi kod mahovina <i>P. patens</i> , <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> u uslovima <i>in vitro</i> .....                                                                    | 139        |
| 4.10. 1. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih peroksidaza .....                                                                                                                        | 139        |
| 4.10. 2. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza .....                                                                                                                           | 141        |
| 4.10. 3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti<br>ukupnih superoksid dismutaza .....                                                                                                            | 143        |
| 4.11. Detekcija aktivnosti peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza kod mahovina <i>P. patens</i> , <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> izlaganih stresu solima u uslovima <i>in vitro</i> ..... | 144        |
| 4.11. 1. Detekcija aktivnosti peroksidaza (POX) u gelu .....                                                                                                                                             | 144        |
| 4.11. 2. Detekcija aktivnosti katalaza (CAT) u gelu.....                                                                                                                                                 | 148        |
| 4.11. 3. Detekcija aktivnosti superoksid dismutaza (SOD) u gelu.....                                                                                                                                     | 151        |
| <b>5. DISKUSIJA .....</b>                                                                                                                                                                                | <b>156</b> |
| 5.1. Uspostavljanje <i>in vitro</i> kulture briofita .....                                                                                                                                               | 156        |
| 5.2. Uticaj hormona (auksina i citokinina) na morfogenezu mahovina<br><i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> .....                                                                                      | 157        |
| 5.3. Morfogeneza mahovina <i>P. patens</i> , <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i><br>u uslovima slanog stresa .....                                                                                   | 159        |
| 5.4. Uloga stresa solima na količinu fotosintetičkih pigmenata kod mahovina<br><i>P. patens</i> , <i>E. hungaricus</i> i <i>H. heimii</i> .....                                                          | 161        |
| 5.5. Neenzimske komponente odbrane ispitivanih vrsta briofita od stresa solima .....                                                                                                                     | 163        |
| 5.6. Uloga antioksidativnih enzima (POX, CAT i SOD) tokom stresa solima<br>kod ispitivanih vrsta.....                                                                                                    | 169        |

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| <b>6. ZAKLJUČCI.....</b> | <b>173</b> |
|--------------------------|------------|

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| <b>7. LITERATURA .....</b> | <b>177</b> |
|----------------------------|------------|

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| <b>BIOGRAFIJA AUTORA.....</b> | <b>200</b> |
|-------------------------------|------------|

**Prilog 1 - Izjava o autorstvu doktorskog rada**

**Prilog 2 - Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

**Prilog 3 - Izjava o korišćenju doktorskog rada**

## SKRAĆENICE

|                               |                                                                                      |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| β-ME                          | β-merkaptetoetanol                                                                   |
| •OH                           | Hidroksilni radikal                                                                  |
| 14-3-3 protein                | Regulator kinaza i fosfataza                                                         |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub>   | Singlet kiseonik                                                                     |
| 2,4-D                         | 2,4-dihlorofenoksisirćetna kiselina                                                  |
| ABA                           | Apscisinska kiselina                                                                 |
| ABC                           | „ATP-binding cassette“ transporter                                                   |
| ADCC                          | Ćelijska citotoksičnost zavisna od antitela                                          |
| <i>AKT1</i>                   | Gen za serin/treonin kinazu                                                          |
| AnnAt1                        | Annexine <i>Arabidopsis thaliana</i> 1- kalcijum i fosfolipid-vezujući proteini      |
| ANOVA                         | Analiza varijanse                                                                    |
| AOX                           | Alternative oksidaze                                                                 |
| APOD                          | Askorbat peroksidaza                                                                 |
| APS                           | Amonijum-persulfat                                                                   |
| AT                            | Aminotransferaza                                                                     |
| AtHKT1                        | Transporteri za natrijum kod <i>Arabidopsis thaliana</i>                             |
| ATP                           | Adenozin-trifosfat                                                                   |
| AU                            | arbitrarne jedinice                                                                  |
| BAP                           | 6-benzilaminopurin                                                                   |
| BSA                           | Bovin serum albumina                                                                 |
| CAM                           | Kalmodulin                                                                           |
| CAT                           | Katalaza                                                                             |
| cDNK                          | Komplementarni lanac DNK                                                             |
| cE                            | koliziona energija                                                                   |
| CID                           | indukovana kolizija                                                                  |
| COR                           | „Cold-regulated“ proteini                                                            |
| DHN                           | Dehydrin-like gen                                                                    |
| DNK                           | Dezoksiribonukleinska kiselina                                                       |
| DPPH                          | 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal                                                 |
| DREB                          | Dehydration-responsive element-binding transkripcioni faktor                         |
| DTT                           | Ditiotreitol                                                                         |
| DUF26                         | „Domain of Unknown Function 26“                                                      |
| EDTA                          | Etilendiamintetrasirćetna kiselina                                                   |
| GA3                           | Giberelna kiselina                                                                   |
| GA7                           | Giberelna kiselina                                                                   |
| GPOD                          | Gvajakol peroksidaza                                                                 |
| GPX                           | Glutation peroksidaza                                                                |
| GR                            | Glutation reduktaza                                                                  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Vodonik peroksid                                                                     |
| His kinaza                    | Histidin kinaza                                                                      |
| HPLC                          | „High-performance liquid chromatography“- Tečna hromatografija pod visokim pritiskom |
| HSP70                         | „Heat-shock protein 70“                                                              |
| HXK                           | Enzim heksokinaza                                                                    |
| IAA                           | Indol-3-sirćetna kiselina                                                            |
| IBA                           | Indol-3-buterna kiselina                                                             |

|                             |                                                                                                                                                    |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IBA                         | Indol-3-buterna kiselina                                                                                                                           |
| IgG                         | Imunoglobulin G                                                                                                                                    |
| KIN                         | Kinetin-6-furfuril-aminopurin                                                                                                                      |
| LEA                         | „Late abundant embryogenesis“ proteini                                                                                                             |
| LSD                         | Least significance distance – test statističke značajnosti                                                                                         |
| MBP                         | „Myelin Basic Protein“ kinaza                                                                                                                      |
| MCamb                       | Kalmodulin vezujući membranski protein                                                                                                             |
| MDHAR                       | Monodehidroaskorbat reduktaza                                                                                                                      |
| NAA                         | $\alpha$ -naftalen-sirćetna kiselina                                                                                                               |
| NAD(P)H                     | Nikotinamin adenin dinukleotid fosfat-oksida                                                                                                       |
| NaDCC                       | Natrijum-dihloroizocijanurat                                                                                                                       |
| Native PAGE                 | Nativna elektroforeza                                                                                                                              |
| NBT                         | Nitro-blue tetrazolijum                                                                                                                            |
| <i>NHX1</i>                 | Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> eXchanger 1 – gen za izmenjivač jona kod <i>Arabidopsis thaliana</i>                                               |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Superoksid anjon radikal                                                                                                                           |
| Orn                         | Ornitin                                                                                                                                            |
| OsRMC                       | Negativni regulator odgovora na stres solima kod pirinča                                                                                           |
| P5C                         | Pirolin-5-karboksilat                                                                                                                              |
| P5CR                        | Enzim pirolin-5-karboksilat reduktaza                                                                                                              |
| P5CS                        | Enzim pirolin-5-karboksilat sintetaza                                                                                                              |
| PIS                         | Product Ion Scanning                                                                                                                               |
| PLP                         | Pirodoksal-5-fosfat                                                                                                                                |
| PMSF                        | Fenilmetilsulfonil fluoroat                                                                                                                        |
| POD                         | Peroksidaza                                                                                                                                        |
| PpDBF1                      | <i>Physcomitrella patens</i> Dehydration-responsive element-binding transkripcioni faktor                                                          |
| <i>PpDHNA</i>               | <i>Physcomitrella patens</i> dehydrin-like gen                                                                                                     |
| PpENA                       | <i>Physcomitrella patens</i> „Exitus Natru“ (exit sodium) – pumpa koja izbacuje Na <sup>+</sup> i omogućava toleranciju visokih koncentracija soli |
| PpSHP                       | <i>Physcomitrella patens</i> „Suppressor of High-copy PP1“                                                                                         |
| PVPP                        | Polivinilpolipirrolidon                                                                                                                            |
| ROS                         | Reactive oxygen species – Reaktivne vrste kiseonika                                                                                                |
| RUBISCO                     | Ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza                                                                                                     |
| sHSP                        | „small Heat-shock proteins“                                                                                                                        |
| SOD                         | Superoksid dismutaza                                                                                                                               |
| SOS put                     | „Salt Overly Sensitive“ put transdukcije signala u stresu solima                                                                                   |
| SOS1                        | Salt overly sensitive 1 – membranski Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter                                                                    |
| SOS2                        | Salt overly sensitive 2 – zavisna serin/treonin kinaza                                                                                             |
| SOS3                        | Salt overly sensitive 3 – kalcijum vezujući protein                                                                                                |
| SOS4                        | Salt overly sensitive 4 – pirodoksal kinaza                                                                                                        |
| SOS5                        | Salt overly sensitive 5 – adhezivni protein                                                                                                        |
| SPS                         | Saharozo-fosfat-sintetaza                                                                                                                          |
| SRM                         | Single Reaction Monitoring                                                                                                                         |
| SS                          | Saharozo sintaza                                                                                                                                   |
| TDZ                         | Tidiazuron-1-fenil-3-tidiazol-5-urea                                                                                                               |
| TEMED                       | N,N,N',N'-tetrametiletildiamin                                                                                                                     |
| TF                          | Transkripcioni faktor                                                                                                                              |
| t <sub>R</sub>              | retenciono vreme                                                                                                                                   |
| Tris                        | Hidroksimetilaminometan                                                                                                                            |



|      |                                                                      |
|------|----------------------------------------------------------------------|
|      | UHPLC/-HESI-MS/MS - Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom |
|      | sa MS/MS masenom spektrofotometrijom                                 |
| UV   | Ultraljubičasto zračenje                                             |
| VEGF | Vaskularni endotelijalni faktor rasta                                |



# *UVOD*



# 1. UVOD

## 1.1. Briofite

Briofite ili mahovine u širem smislu reči (podcarstvo biljaka lat. *Bryobiotina*) su specifična grupa biljaka koja se po svojim karakteristikama izdvaja u odnosu na sve ostale više biljke. Briofite su prve kopnene biljke koje su, iako „najprimitivnije“, bile sposobne da žive van vodenih staništa, ali su za proces razvića i dalje vrlo zavisne od prisustva vode.

Karakteristike koje ih svrstavaju u „niže više biljke“ su nedostatak jasno diferenciranih tkiva i organa, odsustvo provodnih elemenata i zaštitnih slojeva u vidu kutikule. Još jedna od njihovih posebnosti jeste životni ciklus gde je dominantna faza gametofit generacija nasuprot svim drugim višim biljkama. Kompletan životni ciklus briofita zavisao je od prisustva vode, pre svega u fazi razmnožavanja, jer se biflagelatni spermatozoid do jajne ćelije kreće kroz tanak film vode kada je ova prisutna.

Briofite su evolutivno stara grupa biljaka, parafiletskog porekla, koja objedinjuje tri razdela: rožnjače (cl. *Anthocerotophyta*), jetrenjače (cl. *Hepatiocophyta*) i mahovine (cl. *Bryophyta*). Sva tri razdela obuhvataju oko 25000 vrsta, a sam razdeo *Bryophyta* – oko 13000 vrsta (Crum, 2001). U novijim istraživanjima filogenetskih odnosa, sve više briologa prihvata postojanje više od tri navedena tradicionalna razdela. To su razdeli: bele mahovine ili tresetnice (*Shagnophyta*), fenjeraste mahovine ili fenjerače (*Andreaeophyta*), vlasci (*Polytrichophyta*) prave mahovine (*Bryophyta*), talusne jetrenjače (*Marchantiophyta*), listaste jetrenjače (*Jungermannniophyta*), rožnjače (*Anthocerotophyta*) i još neke manje grupe.

Posle cvetnica (*Magnoliopsida*), briofite su najbrojnija grupa kopnenih biljaka (Mishler, 2001), koja ima između 18000 i 28000 vrsta širom sveta, zavisno od prihvaćene nomenklature (Sabovljević, 2000). Fosili spora i talusa nalik današnjim jetrenjačama datiraju pre više od 400 miliona godina (Hallingbäck & Hodgetts, 2000). Zbog njihove relativno nežne građe postoji malo fosilnih nalaza.

Savremene kladističke metode potvrđuju polifiletsko poreklo briofita. U morfološkim analizama većina kladograma prikazuje jetrenjače kao sestrinsku grupu svih ostalih kopnenih biljaka, dok su mahovine u bliskoj vezi sa vaskularnim biljkama u

odnosu na jetrenjače i rožnjače (Kendrick & Crane, 1997). Takođe, novije molekularne analize potvrđuju ovo stanovište i prikazuju jedan od mogućih načina grananja osnove evolucionog stabla. Prema Qui-u (2008), distribucija mitohondrijskih introna grupe II briofiga ukazuje da se prvo u embriofitskoj kladi odvajaju jetrenjače, zatim mahovine, pa rožnjače, a kao poslednje, traheofite.

Ipak ima i drugačijih viđenja evolutivnog razvoja i odvajanja pojedinih grupa briofiga.

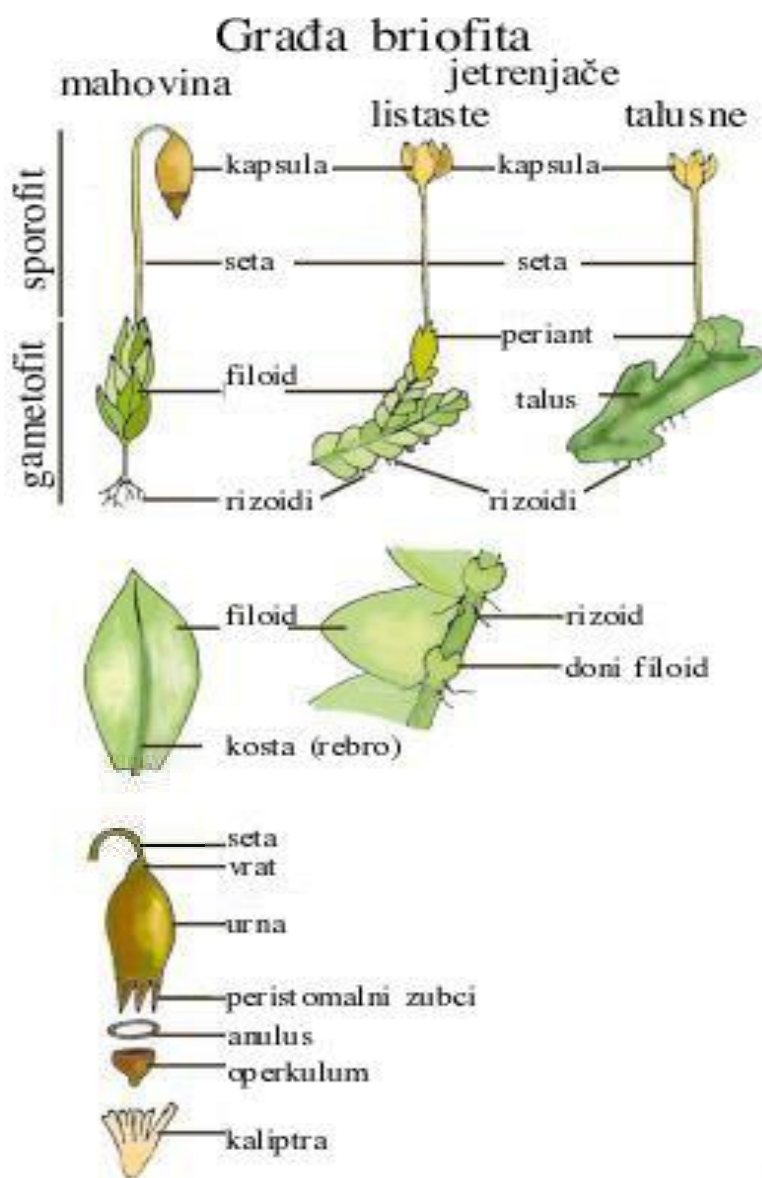
### 1.1.1. Građa briofiga

Vegetativno telo briofiga je haploidni gametofit, koji nema prave vegetativne organe, već poseduje strukture koje nalikuju stablima i listovima vaskularnih biljaka, te se one nazivaju kauloidi i filoidi (Goffinet *et al.*, 2008). Gametofit je dominantna faza u životnom ciklusu briofiga, ima fotosintetsku funkciju, i to je ono što vidimo kao biljku briofige (Sabovljević, 2003). Kod vaskularnih biljaka ova faza je svedena na seksualne organe u cvetićima odnosno na prašnike i tučkove, dok je dominantna sporofit generacija. Kod odrasle biljke briofige uočavaju se dve

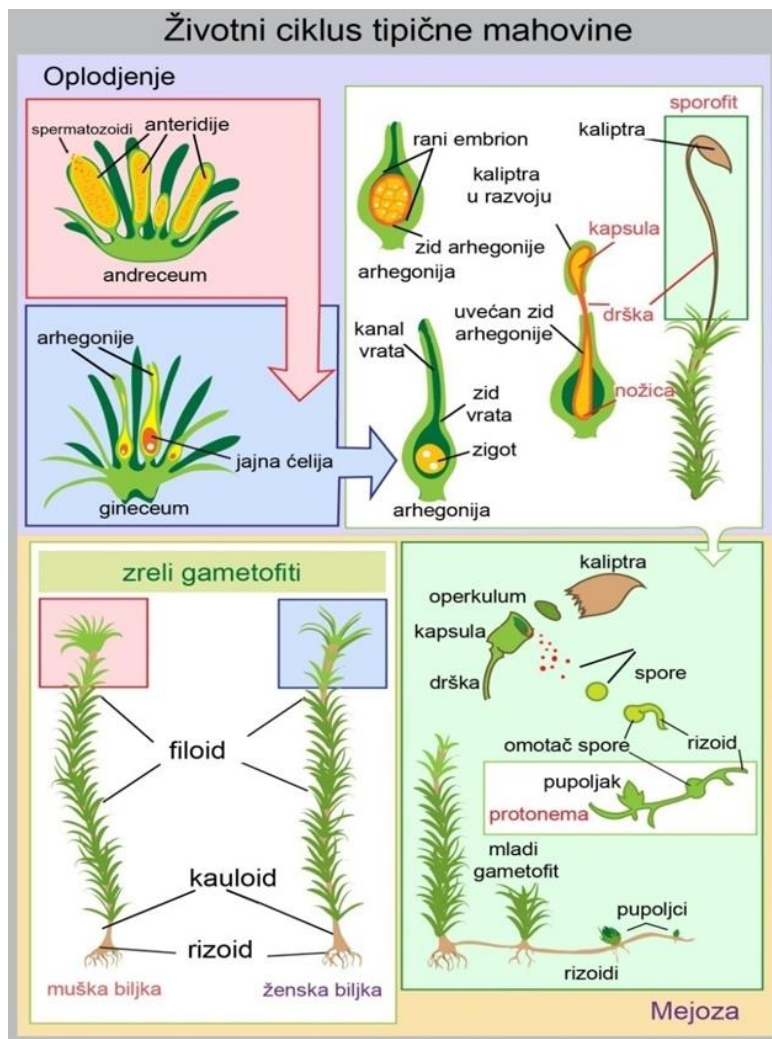
strukture: **gametofit** (zeleni talusni ili listasti deo) i **sporofit** (kapsula sa osnovom)

(Slika 1). **Slika 1.** Shematski prikaz struktura različitih grupa briofiga

(izvor: <https://universe-review.ca/R10-34-anatomy202.htm>)



Briofite nemaju razvijene vegetativne organe koren, stablo i list, ili provodna tkiva kao vaskularne biljke, ali imaju strukture nalik ovim organima koji se označavaju kao **rizoid**, **kauloid** i **filoid**. Samo neke vrste mahovina iz grupe vlasaka (Polytrichophyta), poseduju strukture koje su preteče sasvim razvijenih vaskularnih tkiva, a označavaju se kao **leptom** (analogno floemu) i **hadrom** (analogno ksilemu). Kod većine drugih grupa briofita usvajanje i transport vode i u njoj rastvorenih mineralnih materija vrši se čitavom površinom tela (nemaju kutikulu), pa se za njih kaže da su ektohidrične. Briofite ne mogu da sintetišu lignin (Weng&Chapple, 2010), te stoga nemaju ni mehanička tkiva kakva postoje kod vaskularnih biljaka. To je verovatno i razlog zbog kojeg ne nalazimo briofite raskošnih dimenzija, kao ni fosilne ostatke. Ipak, česti su nalazi da briofite akumuliraju solubilne polipropanoide, kao što su flavonoidi i lignani (Basile *et al.*, 1999; Umezawa, 2003). Kod nekih vrsta se retko u ćelijskom zidu nalaze strukture nalik ligninu, npr. kod mahovine *Rhacocarpus purpurascens* (Umezawa, 2003). Briofite imaju muške polne organe – **anteridije** (u većem broju čine **andreceum**), male kesaste tvorevine u kojima se proizvodi velika količina pokretnih polumesečastih spermatozoida sa dva biča, koji kroz vodu stižu do ženskih polnih organa – **arhegonija** (nekoliko njih je objedinjeno u **gineceum**), flašolikih tvorevina gde svaka sadrži samo po jednu jajnu ćeliju (Slika 2).



**Slika 2.** Životni ciklus briofita.

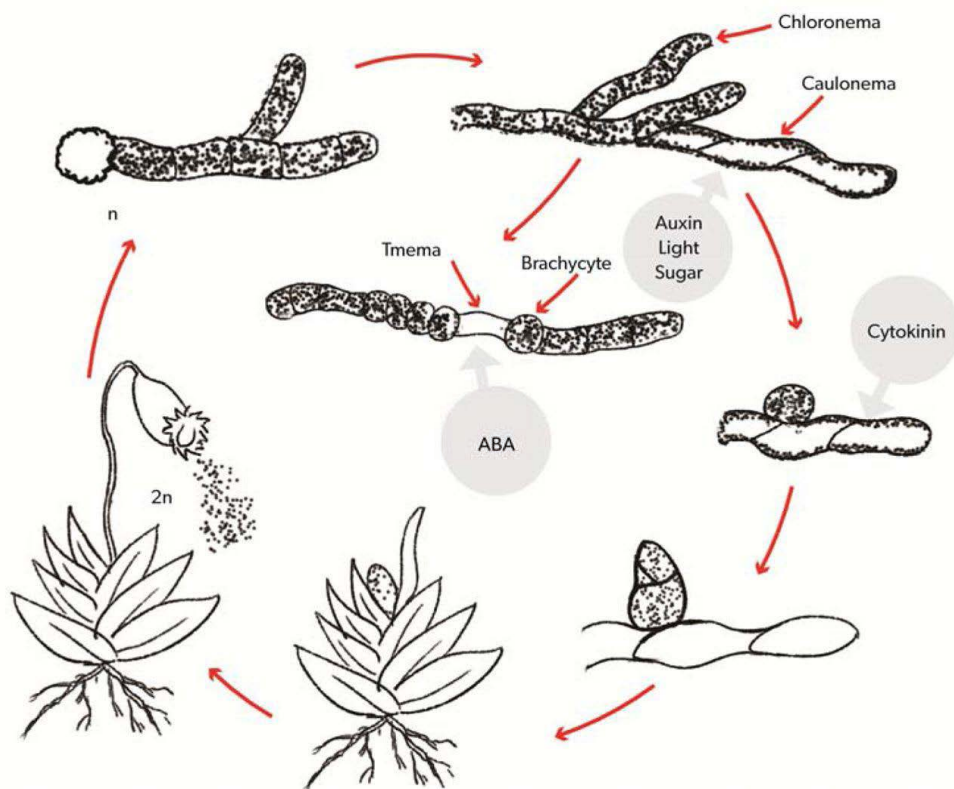
(izvor: <http://bestofpicture.com/bryophyte-structure-sporangium.html>)

Sporofit nastaje kao rezultat oplodjenja jajne ćelije spermatozoidom i krajnji stupanj sporofita jeste **sporogon (kapsula sa sporama)**. Spermatozoid biva privučen hemijskim signalom do arhegonije (pozitivan hemotaksis).

Briofite su u procesu razvića visoko zavisne od vode tj. imaju usku ekovalencu na prisustvo vode (stenovalentni su organizmi u odnosu na prisustvo vode u njihovoj reproduktivnoj fazi). Jajna ćelija razrastanjem najpre daje **pedicelu** ili **setu** koja je jedini organ sporofita koji privremeno vrši fotosintezu. Od vršnog dela sete formira se **kapsula** iz koje se po sazrijevanju oslobađaju spore.

Spore se raznose vetrom, vodom ili na druge načine različitim biogenim vektorima (puževi, insekti, drugi beskičmenjaci, kao i neki sisari). Kada se spora nađe u optimalnim uslovima tj. kada je supstrat odgovarajuće vlažnosti ona klija i nastaje nova tvorevina – **protonema**. Ova struktura je kod većine grupa briofita, kako joj i ime kaže, končasta, ali je kod tresetnica (Sphagnophyta) talusna, pa joj bolje pristaje naziv **protalijum**. Na protonemi se javljaju pupoljci iz kojih će se razviti čitavi gametofiti.

Na protonemi se mogu razlikovati dva tipa niti: **hloronema** i **kaulonema** (Slika 3). Hloronema ima perpendikularno postavljene poprečne zidove i bogata je hloroplastima, dok kaulonema ima koso postavljene poprečne zidove. Hloronema ima funkciju produkcije i osvajanja prostora, dok se na kaulonemi razvijaju pupoljci i rizoidi. Rizoidi imaju funkciju pričvršćivanja za podlogu i nisu struktura analogna korenu, koja služi za usvajanje vode i minerala za čitavu biljku. Filoidi su najčešće jednoslojni, i stoga veoma osetljivi na promene u spoljašnjoj sredini.



**Slika 3.** Shema razvojnih procesa u životnom ciklusu briofita (prema Sabovljević *et al.*, 2014)

## 1.2 Ekologija briofita

Briofite su zastupljene u gotovo svim ekosistemima na zemlji, a česte su i na staništima sa ekstremnim uslovima. Tako se mogu naći u pustinjama, u hladnim i povremeno zamrznutim predelima Arktika i Antarktika, i na visokim planinama, gde često vladaju uslovi fiziološke suše.

Nisu pronađene samo u izuzetno slanim pustinjama bogatim hloridima i sulfatima, na staništima sa jako pokretnom podlogom i u morskim ekosistemima. Ipak, mogu se naći na obalama mora, i da dobro podnose raspršenu morsku vodu talasa, kao što je vrsta *Schistidium maritimum*, koja raste na stenama u Atlanskom priobalju i označena je kao halobriofita (Sabovljević & Sabovljević, 2007).

Uglavnom su terestrične, mada ima i potpuno akvatičnih oblika, kao što su vrste roda *Fontinalis* koje rastu u brzim i dobro aerisanim vodama, ili vrste roda *Sphagnum* koje su prilagođene močvarnom staništu, gde vladaju uslovi hipoksije ili čak anoksije.

Neuobičajena staništa za biljke, na kojima se mogu naći briofite, uključuju ekskremente životinja (familija Splachnaceae), ulaz u pećine sa malom količinom difuznog svetla (rodovi *Cyathodium*, *Mittenia* i *Schistostega*), zaslanjene površine (predstavnicima familije Pottiaceae ili jetrenjače *Carrpos*, *Riella*), pesak (*Aschisma*) i supstrate opterećene teškim metalima (*Scopelophila cataractae*, *Pohlia drummondii*, *Ditrichum plumbicola*, *Mielichhoferia elongata*). Epifitne i epifilne briofite, kao što su mahovina *Ephemeropsis* i jetrenjača *Metzgeria*, mogu se naći na stablima i listovima drugih biljaka, pretežno u tropskim predelima, mada manji broj vrsta naseljava i šume umerenih oblasti (Schofield, 2002).

Briofite su uglavnom kosmopoliti tj. vrste širokog rasprostranjenja, dok su stenoendemiti veoma retki. Areali im se odlikuju kontinentalnim disjunkcijama, što može da ukaže da se brioflorogeneza odigrala veoma rano u geološkoj istoriji Zemlje, i/ili da je izuzetno zastupljena disperzija na velike distance (Schofield, 2002; Munoz *et al.*, 2004). Stenoendemizam na specijskom nivou je svojstven ostrvskim i tropskim florama.

Briofite imaju različite uloge u različitim ekosistemima. U polarnim ekosistemima čine najveći deo biomase, odnosno osnova su produkcije. Veliku biomasu imaju i u tropskim kišnim šumama. U drugim ekosistemima imaju funkciju u regulaciji hidričkog režima staništa, gde igraju ulogu prirodnog biosunđera, time što brže



akumuliraju vodu i nakon toga je duže vremena zadržavaju dostupnu svim članovima ekosistema. Briofite su takođe mikrostaništa mnogih organizama, dok su za druge skloništa ili materijal za gnežđenje. Neke vrste oprašivača provode nepovoljan period godine u briofitama, pa se zbog toga njihovo prisustvo favorizuje u nekim agroekosistemima. Takođe, briofite mogu da posluže i kao hrana, mada je njihova hranljiva vrednost diskutabilna.

Briofite su međutim, najpoznatije kao pioniri u osvajanju golih i negostoljubivih prostora. Ova osobina je od posebnog značaja, jer formiraju primarni sloj tla, omogućavaju dalju sukcesiju vegetacije i naseljavanje drugih bioelementa. Briofite nisu dobri kompetitori pa zbog toga često bivaju istisnute u višim sukcesivnim fazama, i zbog toga je njihova seoba sporama i propagulama, različitim vektorima od izuzetnog značaja u funkcionisanju ekosistema. Značajne su takođe u primarnom vezivanju tla, na odronima i usecima jer površinska protonema u uslovima vlage raste izuzetno brzo. Briofite su najčešće nezavidne veličine, i nezavisno od dužine života, sve su niskog rasta, a vrlo retko se sreću krupni oblici. Predstavnici veličine svega nekoliko milimetara su vrste *Ephemeropsis* i *Viridivellus pulchellum* (Crum, 2001). Među najduže oblike spadaju neke vodene mahovine kojima nisu neophodna potporna tkiva, jer im potporu daje vodena sredina, npr. *Fontinalis antipyretica* (Slika 4), čiji su gametofiti oko 1 metar.



**Slika 4.** *Fontinalis antipyretica*

Izvor: <https://www.flickr.com/photos/tabtannery/8540148536/> Autor: Tab Tannery

Među kopnenim oblicima impozantnih dimenzija je *Dawsonia superba* (Slika 5) (Polytrichophyta), kod koje se javljaju preteče potpornih tkiva, zbog sinteze jedinjenja sličnih ligninu.



**Slika 5.** *Dawsonia superba*

Izvor: [https://farm9.staticflickr.com/8050/8081201420\\_57d1ebfe5e\\_b.jpg](https://farm9.staticflickr.com/8050/8081201420_57d1ebfe5e_b.jpg)

Autor: Mollivan Jon

Trenutno se 94 vrste briofita smatraju globalno ugroženim, mada ih u pojedinim zemljama ima znatno više (Rowntree, 2006). U Srbiji se ugroženim smatra 86 vrsta mahovina i 25 vrsta jetrenjača (Sabovljević *et al.*, 2004). Potrebno je razvijati metode koje će omogućiti masovno umnožavanje mahovina u laboratorijskim uslovima i njihovu reintrodukciju na staništa na kojima su živele. To je vrlo bitno za očuvanje diverziteta briofita i zaštitu ugroženih i retkih vrsta. Relativno mali diverzitet ćelijskih tipova svih tkiva i organa briofita, kao i velika različitost kada je reč o tipovima razvića i fiziološkim odgovorima briofita, čine ovu grupu biljaka vrlo zanimljivio i perspektivno u eksperimentalnim istraživanjima.

### **1.3. Fiziologija briofita**

Sva saznanja kojima danas raspolažemo, a odnose se na fiziologiju briofita, potiču od istraživanja svega nekoliko vrsta briofita, pre svih mahovina: *Funaria hygrometrica*, *Syntrichia ruralis* i *Physcomitrella patens*. Većina podataka o fiziološkim procesima briofita dobijena je istraživanjem gametofita, dominantne fotosintetičke faze u životnom ciklusu ovih biljaka (Bijelović, 2003). Poslednjih godina su rađena fiziološka istraživanja i na jetrenjačama i rožnjačama.

Izvestan broj briofita transportuje fitohormone od ćelije do ćelije (Chopra & Kumra, 1988). Takođe ima podataka da ove biljke vrše ekskreciju fitohormona, a nakon toga koriste egzogene hormone u cilju regulisanja procesa razvića (Beutelmann &

Bauer, 1977). Obzirom da briofite i vaskularne biljke (zajednički označene kao više biljke) imaju zajedničko poreklo i pretke (Mishler *et al.*, 1992), nije iznenađujući podatak da su biljni hormoni koji su opisani, izolovani i funkcionalni kod vaskularnih biljaka, nađeni i kod briofita kod kojih kontrolišu sve fiziološke procese. Međutim, mali je broj radova koji se odnose na metabolizam i fiziološki efekat hormona kod briofita, iako postoje podaci da ove biljke sintetišu auksine, citokinine, gibereline i apscisinsku (lunularnu) kiselinu (Ergun *et al.*, 2002; Sabovljević *et al.*, 2014).

### **1.3.1. Morfogeneza briofita *in vitro***

Totipotencija je sposobnost biljne ćelije da se dediferencira, deli, umnožava, potom selektivno diferencira i regeneriše tkiva, organe, embrione ili ceo biljni organizam. Ova osobina je svojstvena samo biljnim ćelijama, a uočio ju je Haberlandt (1902). Morfogeneza *in vitro* predstavlja regeneraciju organa ili celog biljnog organizma iz organa majke – biljke. Razlikuje se više tipova morfogeneze (mikropropagacija, organogeneza, somatska embriogeneza i somatska hibridizacija) u zavisnosti od tipa eksplantata koji se koristi i načina na koji se regeneranti formiraju.

Put organogeneze i razvika biljnih ćelija zavisi od odnosa auksina i citokinina koji su egzogeno dodati u podlogu (Skoog & Miller, 1957). Izbalansiran odnos auksina i citokinina dovodi do pojave kalusa (kalogeneza). Višak auksina u medijumu indukuje rizogenezu, a višak citokinina kaulogenezu. Proučavanje morfogeneze kod briofita započeto je još početkom XX veka. Iako ova istraživanja datiraju već čitavih stotinu godina, rezultati koji se mogu naći u savremenoj literaturi za briofite nisu ni izbliza opsežni kao što je slučaj sa vaskularnim biljkama.

*In vitro* kultura je prvi put uspešno uspostavljena na mahovinama (Servettaz, 1913). Ako pod *in vitro* kulturom smatramo sterilne kulture gajene na veštačkom medijumu definisanog sastava, jedan od razloga zašto su briofite pogodne je to što se spore u kapsuli sporofita nalaze u sterilnom okruženju, sa izuzetkom endobionata. Najveći broj podataka o morfogenezi briofita, naročito o rastenju i razviku u eksperimentalnim uslovima potiče iz radova malog broja naučnika (Bopp, 1963, 1983, 1990, 2000; Cove & Ashton, 1984; Knoop, 1984; Lal, 1984; Chopra & Kumar, 1988; Bhatla, 1994; Reski, 1998a, b; Bjelović & Sabovljević, 2003; Sabovljević *et al.*, 2003, 2010, 2012a, 2012b; Cvetić *et al.*, 2005; Vujičić *et al.*, 2009, 2010, 2011, 2012).

Kao i kod vaskularnih biljaka, esencijalni hormoni briofita su auksini i citokinini (Sabovljević *et al.*, 2014). Ovi biljni hormoni su najviše proučavani kod mahovina u odnosu na druge grupe hormona (Cove & Ashton, 1984). Odnos auksina i citokinina ima veoma važnu ulogu prilikom dobijanja pupoljaka od protoneme u uslovima *in vitro* (Sabovljević *et al.*, 2010; 2014).

Poznati efekti auksina kod briofita su: inhibicija rasta protoneme, stimulacija formiranja rizoida i indukcija formiranja kalusa (Bopp, 1953; Sokal *et al.*, 1997; Sabovljević *et al.*, 2014). Johri & Desai (1973) su otkrili specifičan efekat auksina da inhibiraju rastenje ćelija hloroneme, kao i indukciju prelaska ćelija iz faze hloroneme u fazu kauloneme. Egzogeni auksini, pri optimalnim koncentracijama, mogu da nadomeste nedostatak svetlosti i time se stvaraju optimalni uslovi za diferencijaciju ćelija kauloneme, kao i za indukciju pupoljaka (Lehnert & Bopp, 1983). Pokazano je da auksini i kod briofita imaju ulogu u apikalnoj dominaciji (Salisbury & Ross, 1992), kao i da visoke koncentracije egzogeno primenjenog auksina inhibitorno utiču na razviće pupoljaka (Bopp, 1953; Hurel-Py, 1953; Kofler, 1959). Kod briofita je najbolje proučeno dejstvo indol-3- sirćetne kiseline (IAA). IAA je prvi put izolovana 1985. godine iz mahovine *P. patens* (Ashton *et al.*, 1985). Ona podstiče formiranje arhegonija kod jetrenjače *Riccia crystallina* i produkciju anteridija kod mahovine *Bryum coronatum*, *B. argenteum* i *Barbula gigantea*, dok citokinini stimulišu indukciju arhegonija kod jetrenjače *R. crystallina*, a sprečavaju razvoj anteridija. Kombinacijom različitog odnosa auksina i citokinina mogu se postići različiti efekti kod briofita (Chopra & Bhatla, 1990; Sabovljević *et al.*, 2012b; Vujičić *et al.*, 2012).

Citokinini su biljni hormoni koji su nazvani po osobini da stimulišu ćelijsku deobu, citokinezu. Svi citokinini su derivati purinske baze adenina, na čijem se atomu azota na šestom mestu nalaze vezane različite grupe. Citokinini u biljci mogu biti slobodni ili konjugovani sa raznim šećerima. Kod mahovina su prvi put otkriveni 1966. godine iz kalusa hibrida *Funaria hydrometrica* x *Physcomitrium pyriforme* (Bauer, 1966). Bauer je ovaj citokinin nazvao briokinin, koji je kasnije gasnom hromatografijom identifikovan kao N6-izoprenil-adenin. Citokinini su zaduženi za formiranje pupoljaka. Takođe određuju položaj pupoljaka duž kauloneme, a zaslužni su i za deobu ćelija u protonemi (Szweykowska *et al.*, 1971). Relativno je malo podataka o koncentraciji endogenih citokinina kod briofita. Eksperimenti u kojima je *Tortella*

*caespitosa* (sin. *T. humilis*) tretirana kinetinom su vrlo značajni za razumevanje procesa razvića protoneme pod uticajem kinetina (Gorton & Eakin, 1957). Ovim eksperimentima je utvrđeno značajno povećanje broja pupoljaka nakon egzogene primene kinetina. Pokazano je da je citokininska aktivnost povezana sa specifičnim morfogenetskim promenama protoneme tokom razvića same protoneme i formiranja mladih biljaka (Bijelović, 2003). Tako je utvrđeno da može doći do reverzije u fazu protoneme onih pupoljaka koji su indukovani citokininima, ukoliko se citokinini od strane iz hranljivog medijuma (Brandes, 1973). Na osnovu ovih podataka, može se zaključiti da su citokinini dovoljan stimulus za indukciju i razviće pupoljaka ukoliko nije prošao određeni vremenski period u kome se diferencijacija odvijala.

Citokinini su naročito dobro proučeni kod vrste *P. patens*. Ova mahovina se često koristi kao model organizam i dosta je dobro istražena. Iz nje su izolovani citokinini izopentenil-adenin i izopentenil-adenozin, a napravljeni su i transgeni mutanti koji nemaju sposobnost produkcije citokinina i mutanti koji imaju njihovu pojačanu produkciju (over-mutanti). Ono što je specifično za dejstvo citokinina kod briofita, jeste da deluju na pojedinačne ćelije biljke i da su ključni za diferencijaciju apikalne ćelije u naredni razvojni stadijum (eng. “bud” stadijum). Malo je podataka o endogenim koncentracijama citokinina kod mahovina. U eksperimentu sa vrstom *P. patens*, stvorene su transgene biljke koje su proizvele više citokinina i auksina nego “wild-type” biljke. Eksperimenti rađeni na ovim biljkama su veoma važni, jer direktno pokazuju koja je uloga određenih biljnih hormona u ćelijama briofita.

Kod briofita je izolovan i specifičan regulator rastenja i razvića poznat kao briokinin, koji može da zameni kinetin kao faktor rastenja u kulturi *in vitro* kod vaskularnih biljaka (Sabovljević *et al.*, 2014). Briokinin je fiziološki aktivan u nekoliko razvojnih faza, na kaulonemi stimuliše razviće pupoljaka.

Postoje mnogobrojni podaci o sinergističkom delovanju auksina i citokinina (Szweykowska, 1962; Sood, 1975; Cove *et al.*, 1984). Pokazano je da kinetin ili benziladenin mogu da indukuju razviće pupoljka na protonemi koja je rasla u uslovima niskog inteziteta svetlosti, samo ako je protonema prethodno bila izložena delovanju auksina.



Giberelini predstavljaju veliku grupu biljnih hormona (do sada je opisano 136). Izolovani su iz gljive *Giberella*, a kasnije su pronađeni u baktetijama (MacMillan, 2001), kao i u mnogim biljnim vrstama, te u jednoćelijskim i višećelijskim algama (Radley, 1961; Kato *et al.*, 1962; Mowat, 1965; Tarakhovskaya *et al.* 2007). Međutim, još uvek nema puno podataka o efektima giberelina na rastenje i razviće briofita, za razliku od auksina, citokinina i apscisinske kiseline (Decker *et al.*, 2006; Yasumura *et al.*, 2007). Chopra & Mehta (1992), kao i Chopra & Dhingra-Babbar (1984) su istraživali efekat giberelina na rastenje i razviće mahovina. Takođe je ispitivan uticaj egzogeno dodatih giberelina (GA<sub>3</sub> i GA<sub>7</sub>) na morfogenezu mahovine *Bryum argenteum*. Oba ispitivana giberelina su pokazala stimulatorni efekat na rastenje i razviće mahovine u uslovima *in vitro* (Sabovljević *et al.*, 2010). U eksperimentima u kojima su korišćeni inhibitori biosinteze giberelina, utvrđeno je da imaju inhibitorni efekat na multiplikaciju izdanaka u uslovima *in vitro*, ali da nemaju inhibitoran efekat na morfogenezu protoneme (Sabovljević *et al.*, 2010). Egzogeno dodati giberelini stimulišu klijanje spora, rast protoneme i produkciju gametofora kod mahovina (Mirta & Allsopp, 1959; Vaarma & Taren, 1963). Pokazano je da pojedini inhibitori sinteze giberelina inhibiraju rastenje i izduživanje gametofita kod jetrenjača (Christianson, 2000).

Apscisinska kiselina (ABA) je jedan od najbitnijih hormona kod biljaka u odgovoru organizma na stres suše. Hartung i saradnici su 1994. godine dokazali prisustvo apscisinske kiseline kod briofita, međutim, do danas nije poznat ceo biosintetski put ovog hormona kod briofita. Izolovali su veću količinu hormona iz vrsta roda *Anthoceros* koje su rasle na sušnim staništima nego kod iste vrste koja je rasla na vlažnijim staništima. Dokazali su i da sporofit vrste *Anthoceros laevis* produkuje ovaj hormon (Hartung *et al.*, 1994).

Etilen je jedini hormon koji je na fiziološkim temperaturama u gasovitom stanju. Njegova hemijska formula je C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> i prvi je član reda nezasićenih ugljovodonika. To je bezbojan gas, slabog mirisa. Prisustvo etilena je dokazano kod jetrenjača (Frederich *et al.*, 1977) i mahovina (Rohwer & Bopp, 1985). Stange i Osborn (1988) su utvrdili da briofite *Riella* i *Marchantia* imaju drugačiji put sinteze etilena od viših biljaka i on do sada nije u potpunosti poznat. Proizvodnja etilena podudara se sa promenom od hloroneme do kauloneme i verovatno je vezana za povećanje produkcije auksina

(Rohwer & Bopp, 1985). Etilen i IAA deluju zajedno kod viših biljaka. Aditivni efekat kod briofita postoji kod nekih vrsta, npr. *Riella helicophilla*, gde izaziva "super" izduženje ćelija (Strange & Ozborn, 1988). Ovaj hormon kod vrste *Fontinalis squamosa* izaziva inhibiciju rastenja i savijanje filoida, koji postaju talasasti (Glime & Rohver, 1983). Ipak, efekti etilena na briofite nisu još uvek detaljnije proučeni.

#### 1.4. Značaj i upotreba briofita

Briofite čine značajnu komponentu vegetacije mnogih delova sveta. Sve intenzivnija istraživanja na polju briologije menjaju odnos prema briofitama i one sve više dobijaju na značaju. Njihov značaj se ogleda na različite načine, počev od nauke, zatim hortikulture, pogodnosti u monitoringu zagađenosti vode, vazduha i zemljišta, a našle su primenu i u farmaceutskoj industriji.

U prvim decenijama XX veka genetička istraživanja briofita bila su preteča u sličnim istraživanjima kod vaskularnih biljaka. Otkrića kao što su: prvi polni hromozomi, nasleđivanje po ne-Mendelovim principima i upotreba X-zraka u genetičkim istraživanjima bila su postignuta od strane naučnika koji su radili istraživanja na briofitama (Allen, 1917; Knopp, 1936). Bopp i saradnici su proučavali fiziološku osnovu razvića *F. hygrometrica* (Bopp, 1990, 2000; Bopp & Atzorn, 1992.). Postoji mnoštvo razloga zašto treba nastaviti istraživanja u oblasti fiziologije briofita u budućnosti. Zahvaljujući brzom razviću i dominantnoj haploidnoj generaciji, *in vitro* kultura briofita može pomoći u daljem razumevanju ćelijske, genetičke i molekularne baze morfogeneze mahovina, ali i drugih organizama.

Briofite poseduju nekoliko karakteristika koje ih čine posebno pogodnim za proučavanja na makroevolucionom nivou: morfološki i genetički su jednostavne. Druga su grupa po brojnosti među kopnenim biljkama (Mishler, 2001). Stoga se smatra da su briofite ključ za razumevanje međusobnih veza u grupi embriofita i načina na koji su one osvojile kopno i tako se odvojile od svojih predaka, preteča zelenih algi (Chlorophyta).

Iako su malih dimenzija, mahovine imaju značajnu ulogu u ekosistemima. One su, takođe, dobri indikatori stanja u životnoj sredini. Prisustvo mahovina na određenom staništu može ukazivati na sadržaj nutrijenata, količinu vode, pH vrednosti ili prisustvo

nekog zagađivača. Često su dobro razvijene na šumskom zemljištu, gde doprinose zadržavanju vode i mineralnih materija, omogućavajući tako povoljnu temperaturu i dostupne organske materije nakon svog uginuća, te stoga predstavljaju dobru podlogu za klijanje semena mnogih drvenastih vrsta (npr. jastuci mahovine *Hypnum cupressiforme*). Neke vrste intenzivno akumuliraju teške metale i zadržavaju ih duži period posle smrti, jer je oslobađanje ovakvih supstanci veoma sporo. Stoga se briofite mogu koristiti za uklanjanje teških metala i zagađivača iz životne sredine (Mishler, 2001).

Briofite lako akumuliraju K, Ca i Mg iz kišnice i učestvuju u depoziciji materija iz atmosfere. Takođe, u hladnijim regionima severne hemisfere učestvuju u fiksaciji azota, veoma bitnog elementa za rastenje i razviće drugih biljnih vrsta. Posebno su značajne vrste roda *Sphagnum*, koje dominiraju u močvarama, gde sa uginulim biljnim ostacima učestvuju u formiranju treseta. U tresetu je vezana velika količina ugljenika, koja se na taj način isključuje iz ciklusa kruženja. Osim toga, treset deluje i kao rezervoar vode, koja se postepeno može oslobađati i tokom sušnih perioda doprineti hidričkom režimu staništa (Glime, 2007). Treset ima veliki ekonomski značaj. Koristi se u zemljoradnji i hortikulturi kao đubrivo, kao izvor energije (gorivo), za ekstrakciju organskih produkata, u proizvodnji viskija i kao izolator toplote (Schofield, 2002). U arktičkim zonama briofite imaju veliki značaj u održavanju permafrosta.

Briofite su važan zaklon i životna sredina za mnoge organizme: protozoe, rotatorije, nematode, razne gliste, puževe, insekte i paukove kao i za neke vaskularne biljke i gljive. Zbog jednog ili tek nekoliko slojeva ćelija, mahovine nisu omiljene u ishrani životinja. Puno celuloze iz ćelijskih zidova zahteva puno energije u varenju ovih biljaka. Prilagođeni organizmi koji su predatori ovih biljaka su kičmenjaci (leminzi i irvasi). Postoje podaci da su flavonoidi mahovina odgovorni za čudno ponašanje leminga u vreme kalamiteta njihovih populacija, kada su primorani da konzumiraju mahovine više nego u normalnim okolnostima zbog nedostatka druge hrane (Smith, 1982). Briofite su takođe važan materijal za gnežđenje mnogih ptica. Neki sisari takođe oblažu svoje brloge mahovinama.

Briofite su značajan izvor velikog broja jedinjenja, pre svega sekundarnih metabolita, koji se mogu koristiti u farmaceutskoj industriji. Kao lekovite biljke koriste



se za tretiranje opekotina, raznih infekcija, respiratornih i srčanih problema, bolesti jetre i drugih organa. U uslovima *in vitro*, pokazana su antimikrobna i antifungalna dejstva ekstrakata nekih vrsta mahovina (Sabovljević *et al.*, 2006, 2011; Pejinet *et al.*, 2012). Rod *Sphagnum* ima antibiotska svojstva, pa se može koristiti u lečenju bakterijskih infekcija. Sekundarni metaboliti mahovina pokazuju i antiproliferativnu i antiinflamatornu aktivnost, pa bi unapređenje tehnika za njihovu izolaciju i produkciju mogao da bude ključni korak u proizvodnji lekova za maligna oboljenja. (Glime, 2007)

Mahovina *P. patens*, se koristi za produkciju rekombinantnih farmaceutskih proteina (eng. „molecular farming“) (Decker & Reski, 2008). Visok stepen homologe rekombinacije jedarne DNK, pored dominantne haploidne faze u životnom ciklusu, postavlja briofite u centar molekularno-genetičkih istraživanja. Korišćenjem odgovarajućih genskih konstrukata, mogu se napraviti „knockout“ mutanti, na osnovu kojih se može proučavati funkcija gena (Frank *et al.*, 2005). Upotreba briofita u biotehnologiji je velika, posebno zbog velikog broja jedinjenja koja sintetišu, ali i zbog standardizovanih uslova gajenja (Sabovljević & Sabovljević, 2008, 2010). Najčešći način produkcije velike biomase briofita jeste uspostavljanje brioreaktora. Pored mnogobrojnih primena, briofite se najčešće u biotehnologiji koriste za proizvodnju farmaceutskih proteina.

Pre nekoliko godina, *P. patens* je predložena kao alternativa za produkciju rekombinantnih proteina, upravo zbog efikasne mitotičke homologe rekombinacije (Decker & Reski, 2008). Pored toga, bitno je to što biljke imaju konzerviranu šemu glikozilacije među vrstama i manji diverzitet *N*-glikana (Decker *et al.*, 2014). To je od posebnog značaja za proizvodnju rekombinantnih proteina, jer se sazrevanjem proteina u Goldži aparatu i endoplazmatičnom retikulumu mogu izmeniti mesta glikozilacije. Kao što je napomenuto, pravilna glikozilacija proteina je vrlo česta i važna modifikacija u produkciji biofarmaceutika. Razlika u samo delu šećera može rezultovati u nefunkcionalnom proteinu ili izazvati alergijske reakcije pacijenata. Uspešnim „knockout“-om gena koji kodiraju enzime glikotransferaze, rešen je ovaj problem (Koprivova *et al.*, 2004). Umesto gena za  $\alpha$ 1,3-fukoziltransferazu i  $\beta$ 1,2-ksiloziltransferazu, koji katalizuju transfer respektivnih šećera na glikanski lanac, uveden je homologom rekombinacijom ljudski gen za enzim  $\beta$ -1,4-galaktoziltransferazu

(Decker *et al.*, 2014). Na ovaj način je *P. patens* u potpunosti lišena šećera koji izazivaju alergijske reakcije, bez efekta na ostatak lanca *N*-glikana. Povoljno je i to što ovakva izmena proteinske glikozilacije nema uticaj na rastenje i razviće biljaka i sekreciju rekombinantnih faktora rasta u uslovima *in vitro* (Reski & Frank, 2005). Pored toga, u farmaciji se proizvode i monoklonska antitela, vaskularni endotelijalni faktor rasta i eritropoetin (Decker *et al.*, 2014).

Usled standardizovanih uslova gajenja *P. patens*, sekrecija proizvedenih biofarmaceutika je od velikog značaja. Prvenstveno, omogućeno je kontinuirano sakupljanje proizvoda iz prostog mineralnog medijuma, koji ne sadrži aditive. Na taj način su izolacija i prečišćavanje rekombinantnih proteina („downstream processing“) olakšani u poređenju sa drugim sistemima. Pritom, sekretorni sistem je poželjan da bi usmerio nastale proteine kroz endoplazmatični retikulum i Goldžijev aparat, koji su odgovorni za *N*-glikozilaciju i druge posttranslacione modifikacije (Beike *et al.*, 2010).

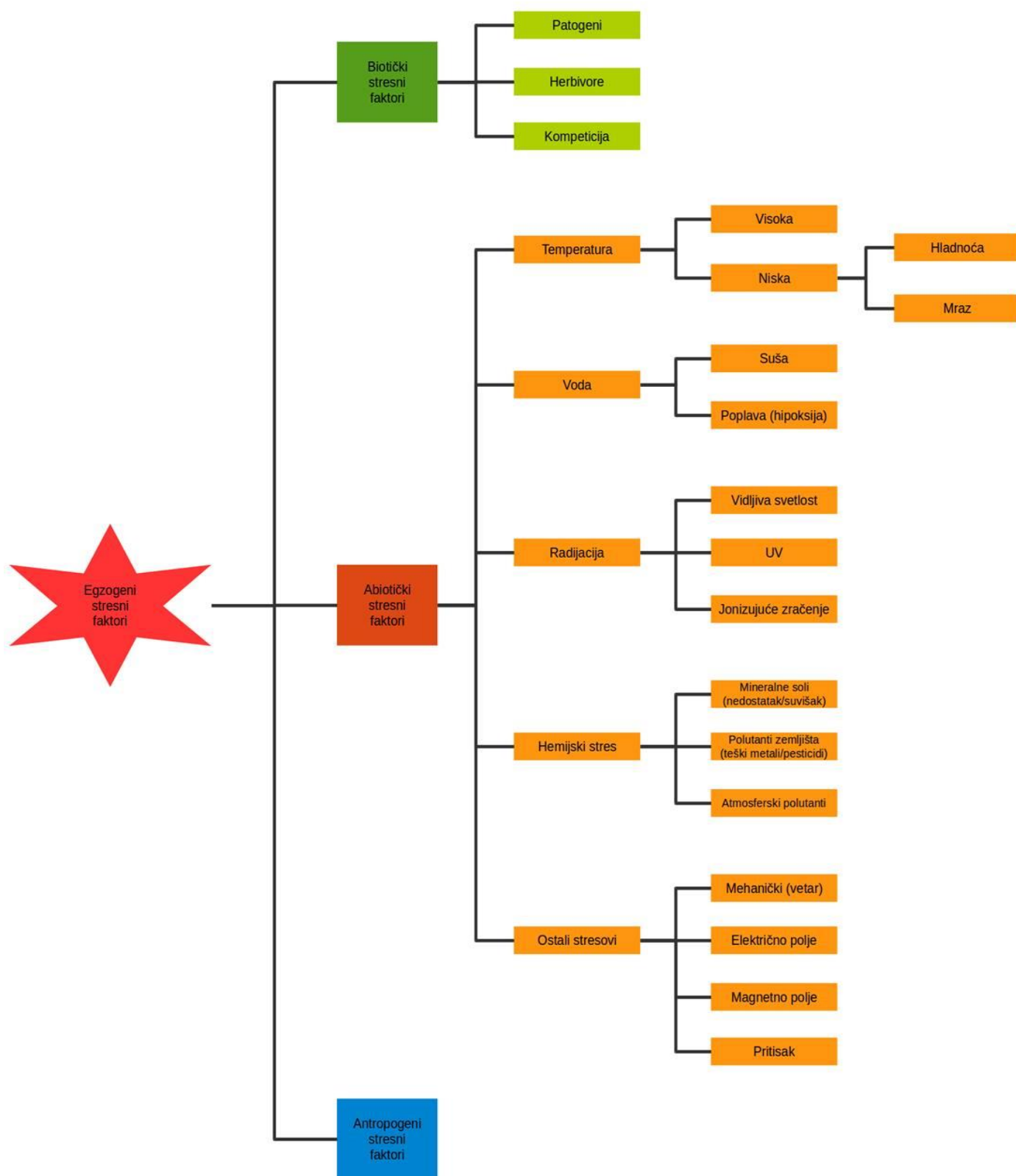
Sojevi *P. patens*, koji su podvrgnuti gliko-inženjeringu, koriste se za proizvodnju farmaceutskih proteina, od kojih su najznačajniji: vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF) (Koprivova *et al.*, 2004), imunoglobulin G antitela (IgG) (Gorr & Jost, 2005) i eritropoetin (Weise *et al.*, 2007). Monoklonalna antitela, dobijena na ovakav način, pokazuju jaču ćelijsku citotoksičnost zavisnu od antitela (ADCC), nego kada se proizvode u ćelijama sisara (Decker *et al.*, 2014).

### **1.5. Fiziologija stresa**

Stres je svako stanje biološkog sistema koje odstupa od optimalne funkcije. Različiti autori daju različite definicije stresa. Taiz & Zeiger (2002), definišu stres kao spoljašnji faktor koji ispoljava nepovoljan uticaj na biljku, pri čemu se najviše misli na abiotički stres. Prema Nilsenu i Orcutt-u (1996), stres predstavlja specifičan odgovor biljaka na negativne faktore koji teže da poremete postojeću ravnotežu (homeostazu) u organizmu. Suština stresa se ogleda u promenama fiziološkog stanja organizma, koje dovode do ugrožavanja normalnog odvijanja životnih procesa u biljkama (Gaspar *et al.*, 2002).

Stres je dakle stanje organizma čije funkcionisanje odstupa od normalnog, pod dejstvom suboptimalnih faktora. U prirodnim uslovima dejstvo faktora je obično grupno, pa se kaže da deluju sinergistički (negativno ili pozitivno), ili pak antagonistički. U laboratorijskim (kontrolisanim) uslovima, uobičajeno je ispitivanje i definisanje dejstva jednog izabranog faktora. Biljke su kao sésilni organizmi stalno izložene abiotičkim i biotičkim faktorima spoljašnje sredine. Oba tipa stresa koji su izazvani ovim faktorima nepovoljno utiču na rastenje i razviće biljaka. U prirodnim ekosistemima retko da jedan stresogeni faktor deluje samostalno. Suša, salinizacija i ekstremne temperature su blisko povezani i njihovi fiziološki efekti se preklapaju (Krasensky & Jonak, 2012).

U zavisnosti od faktora koji izazivaju stres, stres može biti: abiotički, biotički i antropogeni (Slika 6).



**Slika 6.** Faktori sredine koji izazivaju stres kod biljaka

### 1.5.1. Fiziologija stresa kod biljaka

Negativan uticaj neživih činioca na živi organizam u specifičnom okruženju predstavlja abiotički stres. Ovaj stres može biti izazvan: nedostatkom, ali i viškom vode, niskom i visokom temperaturom, niskim i visokim intenzitetom svetlosti, anaerobnim uslovima i visokom koncentracijom kiseonika, niskom i povećanom koncentracijom mineralnih soli, jonizujućim zračenjem kao i polutantima. Navedeni faktori se mogu definisati kao stresori ili induceri stresa. Dejstvo abiotičkih faktora obično nije izolovano, nego su oni povezani međusobno, pa se takav efekat označava kao „stresni sindrom“ (Nešković *et al.*, 2010). Dejstvo stresnih faktora može biti primarno, ali i sekundarno, nastalo kao rezultat delovanja primarnih faktora. U sekundarne stresore spadaju oksidativni i osmotski stres, koji mogu biti indukovani sušom, ekstremnim temperaturama i solima u podlozi (Stikić & Jovanović, 2012). U zavisnosti od intenziteta, dužine trajanja i faze razvika biljke, dejstvo stresogenih faktora može da bude letalno (dovodi do uginuća biljke) i subletalno (biljke se mogu adaptirati promenom ekspresije gena, sintezom proteina stresa ili nakupljanjem osmolita u ćeliji).

Generalno biljke poseduju određenu toleranciju prema stresnim uslovima, ukoliko oni ne prevazilaze plastičnost biljne vrste. Pod tolerancijom se podrazumeva mogućnost biljke da se nosi sa iznenadnim nepovoljnim uslovima sredine. Kada nastupe stresni uslovi, biljka pretrpi određena oštećenja i njeni funkcionalni proteini nisu više dovoljno efikasni. Da bi se biljka prilagodila, sintetiše nove proteine koji su efikasni u novonastalim uslovima. Mehanizmi koji omogućavaju biljci da preživi u uslovima stresa jesu mehanizmi rezistencije. Ovi mehanizmi biljci omogućavaju da toleriše ili izbegava stres.

Tolerancija predstavlja mehanizam kojim se omogućava visoka metabolička aktivnost (slična kao u odsustvu stresogena) usled blagog stresa i redukovana metabolička aktivnost u slučaju pojave jačeg delovanja stresa. Mehanizmi izbegavanja uključuju redukovanu metaboličku aktivnost koja rezultuje pojavom perioda mirovanja usled intenzivnog delovanja stresora. Tokom procesa evolucije biljaka došlo je do razvoja tolerancije i izbegavanja stresa.

Odgovor biljke na stresne uslove sredine se javlja na svim nivoima organizacije, od anatomskih i morfoloških osobina do ćelijskog, biohemijskog i molekularnog nivoa,

koji podrazumeva promenu ekspresije gena. Na molekularnom i ćelijskom nivou, biljka mora da detektuje stres, prenese informaciju o stresnim uslovima od organa koji prima informaciju o stresu do svih drugih delova biljke, a zatim promeni način ekspresije pojedinih gena vezanih za stres. Produkti tih gena su enzimi za reparaciju DNK, enzimi glavnih metaboličkih procesa, zaštitni proteini i metaboliti (betaini, “heat-shock” proteini). Neki od hemijskih signala kojima se prenosi informacija o stresu su reaktivne vrste kiseonika, šećeri,  $\text{Ca}^{2+}$  i biljni hormoni.

Da bi biljke, koje su sesilni organizmi, reagovala na dejstvo faktora spoljašnje sredine moraju da prepoznaju te faktore i da daju efikasan odgovor na njih. Biljke prepoznaju stres najčešće na nivou membrane i to zahvaljujući specifičnim receptornim proteinima za koje se vezuju signalni molekuli. Fiziološko-hemijske promene komponenti ćelija na stres započinju percepcijom signala, vezivanjem signalnih molekula (liganada) za receptore na nivou membrane, zatim se informacija o stresu prenosi kroz ćeliju (transdukcija ili prenos signala). Tokom transdukcije dolazi do ekspresije specifičnih gena i sinteze proteina, a samim tim i do specifičnog metaboličkog odgovora na osnovu koga će nastati određena fiziološka reakcija.

### **1.5.2. Fiziologija stresa kod briofita**

Ranije se smatralo da svak itip stresa uključuje posebne mehanizme odgovora kod biljaka, međutim istraživanja su pokazala da su mehanizmi odbrane i signalni putevi za različite oblike stresa vrlo povezani. Nasuprot vaskularnim biljkama, briofite na stres ne odgovaraju na nivou organa ili tkiva, već na ćelijskom nivou.

Abiotički stresori, posebno osmotski stres i niske temperature, dovode do prolaznog povećanja unutarćelijskog  $\text{Ca}^{2+}$ , koga vezuje kalmodulin (CAM). Ovakav kompleks se vezuje za C-terminalni domen membranskih proteina, kao što su MCamb1 i MCamb2 kod *P. patens*, koji predstavljaju analoge ulaznih kanala za  $\text{K}^+$  kod drugih eukariotskih organizama. Na ovaj način dolazi do ulaska  $\text{K}^+$  u ćelije i razvoja odgovora na stres solima (Takezawa & Minami, 2004).

Činjenica da ekspresiju gena za MCamb1 i MCamb2 kod *P. patens* indukuje stres solima, ukazuje da  $\text{Ca}^{2+}$  joni imaju važnu ulogu u signalnim putevima stvarajući otpornost (rezistenciju), kroz modulaciju stres inducibilnih CAM-vezujućih membranskih transportera kod briofita (Takezawa & Minami, 2004; Wang *et al.*, 2008a).

Regulacija transkripcije je glavni mehanizam kojim ćelija ili organizam reguliše ekspresiju gena, što je od posebnog značaja u stresnim uslovima. Specifični transkripcioni faktori (TF) mahovina pokazuju visok stepen analogije sa transkripcionim faktorima vaskularnih biljaka, posebno onima koji učestvuju u toleranciji na dehidraciju, što ukazuje da mahovine i traheofite poseduju slične sisteme regulacije, koji su se javili rano u evoluciji i ostali konzervirani među različitim grupama biljaka (Martinez, 2002; Wang *et al.*, 2008a). Homolog TF-DREB izolovan kod *P. patens* je TF-PpDBF1, i aktivira se kada je *P. patens* izložena stresu solima. Ovo pokazuje da DREB kod vaskularnih biljaka i PpDBF1 kod *P. patens* imaju sličnu funkciju, pa samim tim postoji i sličnost u regulatornom sistemu briofita i vaskularnih biljaka (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008).

Brojna istraživanja tolerancije mahovina na stres pokazala su da ABA igra ključnu ulogu u kontroli odgovora koji su esencijani za adaptaciju na abiotički stres (Ruibal *et al.*, 2013). Regulacija se može odvijati preko ABA-zavisnog i ABA-nezavisnog puta. ABA dovodi do indukcije ekspresije gena koji kodiraju proteine značajne za odbranu i zaštitu ćelija pri stresu solima ili proteinske komponente regulatorne mreže. Tretman ABA, NaCl ili manitolom kod *P. patens* doveo je do povećane ekspresije *PpDHNA* gena (dehydrin-like-gene), što je ukazalo da je ovaj gen kod *P. patens* bitan za toleranciju na osmotski stres (Saavedra *et al.*, 2006). Daljim eksperimentima je pokazano da je *PpDHNA* gen, analogan *DHN* (dehydrin-like) genu odgovornom za toleranciju na stres kod vaskularnih biljaka (Saavedra *et al.*, 2006). Eksperimentalno je dokazano i da tretiranje mahovine *P. patens* visokom koncentracijom NaCl i manitolom, povećava toleranciju na stres izazvan niskim temperaturama (Minami *et al.*, 2003).

## 1.6. Stres solima

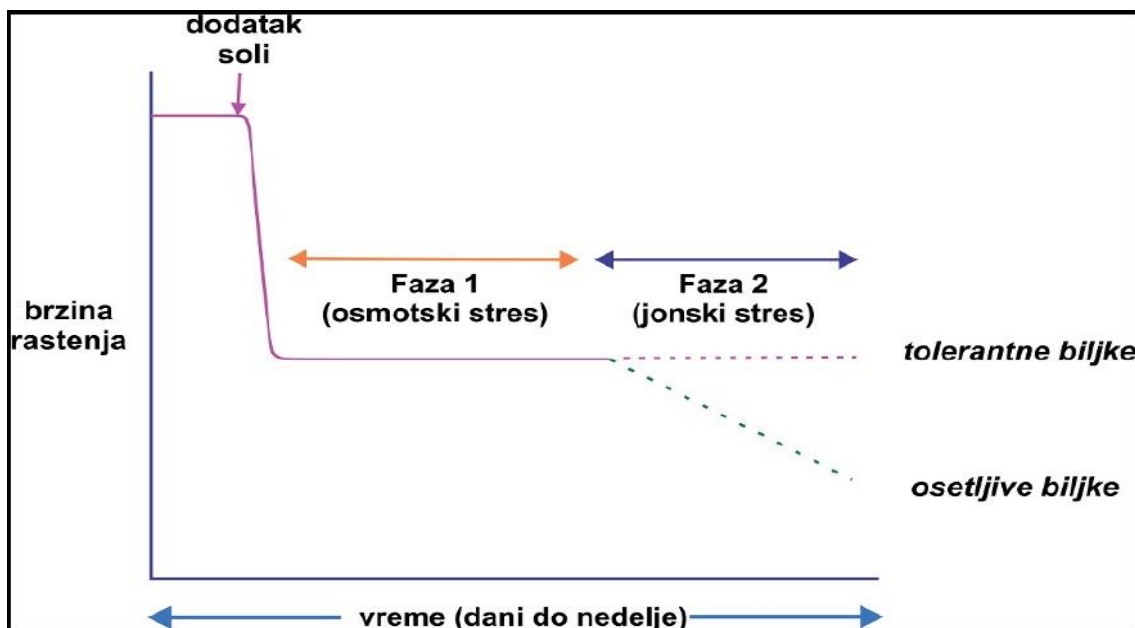
Salinitet predstavlja stanje zemljišta koje se karakteriše visokim koncentracijama rastvorljivih soli. Uglavnom su to soli hlorida natrijuma, kalcijuma i magnezijuma, a u ređim slučajevima sulfati i karbonati (Le & McQueen-Mason, 2006; Galvani, 2007; Munns & Tester, 2008). Povećanje saliniteta je postao globalan problem, koji u nekim regionima u kojima nije bio posebno izražen u novije vreme postaje sve prisutniji. Oko 800 miliona hektara zemljišta širom sveta spada u grupu zaslanjenih zemljišta, a to predstavlja više od 6% ukupne kopnene mase na Zemlji.

Specifičnost zaslanjenih zemljišta, tj. specifične fizičko-hemijske osobine uslovljavaju pojavu različitih ekoloških grupa biljaka, koje su adaptirane i uspevaju da opstanu u uslovima povećane koncentracije soli. Većina biljaka je osetljiva na povećane koncentracije soli u podlozi, što u velikoj meri može da ograniči produktivnost i dovede do smanjenja prinosa, kao i biomase biljaka (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). Biljke koje su prilagođene životu na zaslanjenim zemljištima označene su kao halofite (Stevanović & Janković, 2001). Sadržaj soli u zemljištu varira vremenski i prostorno i uslovljen je dejstvom različitih spoljašnjih faktora. Zemljište je slano ako mu je električna provodljivost veća od  $4 \text{ dS m}^{-1}$ , što je ekvivalentno koncentraciji NaCl od 40 mM (USSL, 2005).

### 1.6.1. Stres solima kod biljaka

Visoka koncentracija soli u zemljištu na dva načina ugrožava opstanak i preživljavanje biljaka. Pri negativnom osmotskom potencijalu podloge, biljke ne mogu da usvajaju vodu i da održe balans između transpiracije i apsorpcije vode (osmotski stres). Pored toga biljke ne mogu da spreče pasivno primanje soli i akumulaciju do toksičnih nivoa (jonski stres). Neki od autora opisuju dvofazni model odgovora biljaka na stres solima (Slika 7) i razdvajaju dve vremenski odvojene faze (Munns, 1993, 2002, 2005; Munns & Tester, 2008).





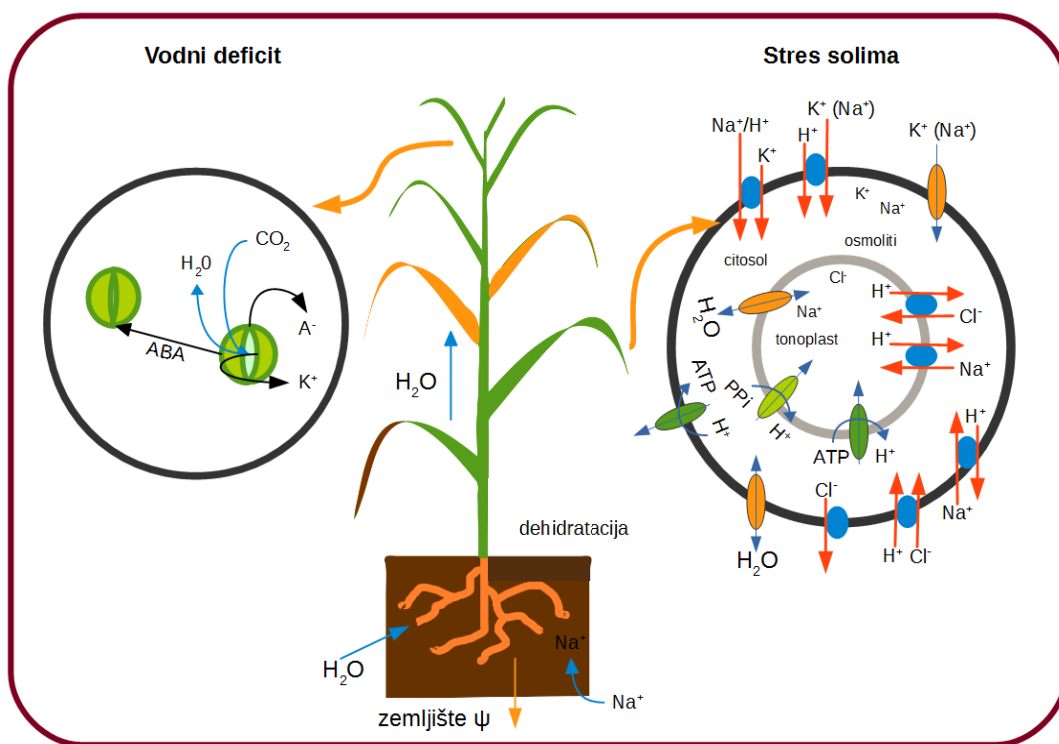
**Slika 7.** Šema dvofaznog odgovora biljaka na stres solima (modifikovano prema Munns, 2005).

U prvoj fazi, usled osmotskog stresa, dolazi do brze redukcije rastenja (pre svega novih izdanaka i listova, jer su oni znatno osetljiviji). Ovaj efekat nastaje zbog smanjene sposobnosti biljaka da apsorbuju vodu (Carillo *et al.*, 2011).

U drugoj fazi, redukcija rastenja je rezultat akumulacije soli u listovima, što dovodi do toksičnog efekta jonskog stresa. Efekat se primarno javlja kod starijih listova, koji su završili svoje rastenje i koji imaju smanjenu sposobnost kompartmentizacije soli u vakuoli. Kod većine biljaka se toksične koncentracije  $\text{Na}^+$  dostižu mnogo pre nego u slučaju  $\text{Cl}^-$ . Pri visokim koncentracijama joni  $\text{Na}^+$  mogu da istisnu jone  $\text{Ca}^{2+}$  iz plazma membrane, što dovodi do promene u propustljivosti membrane i daljem curenju  $\text{K}^+$  iz ćelija (Cramer *et al.*, 1985). Kao posledica jonskog stresa dolazi i do pojave sekundarnog, oksidativnog stresa koji je praćen pojavom *ROS* formi (“reactive oxygen species” – reaktivni oblici kiseonika), koje su potencijalno štetne za integritet membrane i pravilnu funkciju proteina, enzima i nukleinskih kiselina. Fotosinteza je inhibirana ako se u hloroplastima akumulira velika količina  $\text{Na}^+$  i/ili  $\text{Cl}^-$ , jer dolazi do inhibicije fotosistema II (Kalaji *et al.*, 2011), pa stres solima oštećuje aktivnost ektron transportnog lanca (Mehta *et al.*, 2010). Inhibicija rastenja mladih listova nastaje usled

smanjene proizvodnje asimilata, što dodatno redukuje rastenje, posebno kod osetljivih biljaka (Carillo *et al.*, 2011).

Kao posledica stresa solima javlja se dehidracija i pad turgorovog pritiska, a to sve dovodi do inhibicije deobe i izduživanja ćelija. Takođe, povećana koncentracija soli u podlozi inhibira rastenje biljaka i smanjuje produktivnost (Galvani, 2007; Chen *et al.*, 2010; Ranganayakulu *et al.*, 2013; Shahbaz *et al.* 2013). Ovaj efekat soli je sličan efektu vodnog deficita (suša) i većina biljaka na prekomeran salinitet odgovara na isti način kao i na vodni deficit (Taiz & Zeiger, 2010). Razlika je u tome što kod vodnog deficita nema fizički dostupne vode za usvajanje (fizička suša), dok je kod osmotskog stresa voda prisutna, čak ponekad i u velikim količinama, ali biljke ne mogu da je usvoje u dovoljnoj meri, jer je nizak vodni potencijal podloge (fiziološka suša) (Slika 8).

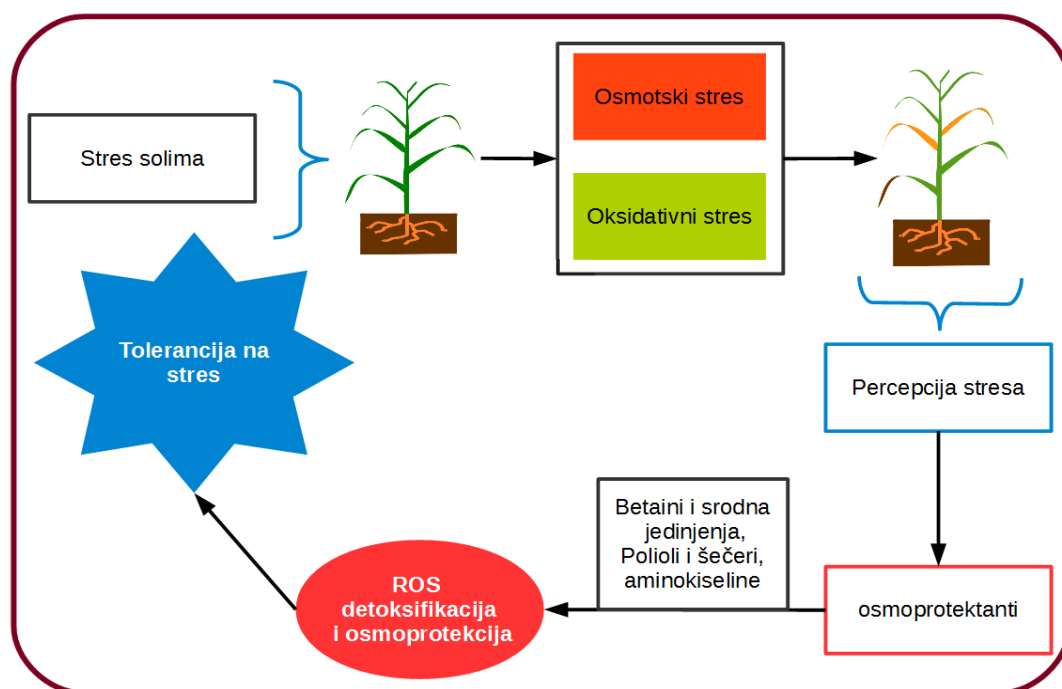


**Slika 8.** Mehanizam odbrane biljaka prilikom vodnog deficita i stresa solima. (Uticaj povećane koncentracije natrijuma u podlozi na pojavu vodnog deficita i stresa solima)

U odgovoru na stres solima biljke su izgradile različite strategije, uključujući i modifikacije u različitim fiziološkim i biohemijskim procesima kako bi preživele u novonastalim uslovima (Faical *et al.*, 2009; Ranganayakulu *et al.*, 2013). Reakcija

biljaka tokom osmoregulacije se ogleda u povećanom primanju soli i sintezi osmotski aktivnih organskih jedinjenja, čime se snižava osmotski potencijal korena i omogućava primanje vode. Nizak osmotski potencijal u citoplazmi, kojim se ostvaruje ravnoteža sa vakuolom i spoljašnjom sredinom, postiže se sintezom organskih jedinjenja koja su označena kao osmoliti i/ili osmoprotektanti.

Osmotski stres dovodi do povećanja nivoa transkripcije gena za nekoliko biljnih protein kinaza (Liu & van Staden, 2000; Zhu, 2002), uključujući gene za dvokomponentnu His kinazu i mitogen-aktiviranu protein kinazu (Mikolajczyk *et al.*, 2000; Munnik *et al.*, 2000). Membranski fosfolipidi, pored toga što imaju bitnu ulogu kao gradivna komponenta membrana, predstavljaju bitnu komponentu koja generiše mnoštvo signalnih molekula (npr. šećera) tokom stresa solima (Munnik *et al.*, 2000; DeWald *et al.*, 2001; Zhu, 2002). U odgovoru na stres solima biljke su izgradile više strategija, uključujući i modifikacije u različitim fiziološkim i biohemijskim procesima, poput percepcije i transdukcije signala kako bi preživele u ovakvim uslovima (Slika 9) (Faical *et al.*, 2009; Ranganayakulu *et al.*, 2013).

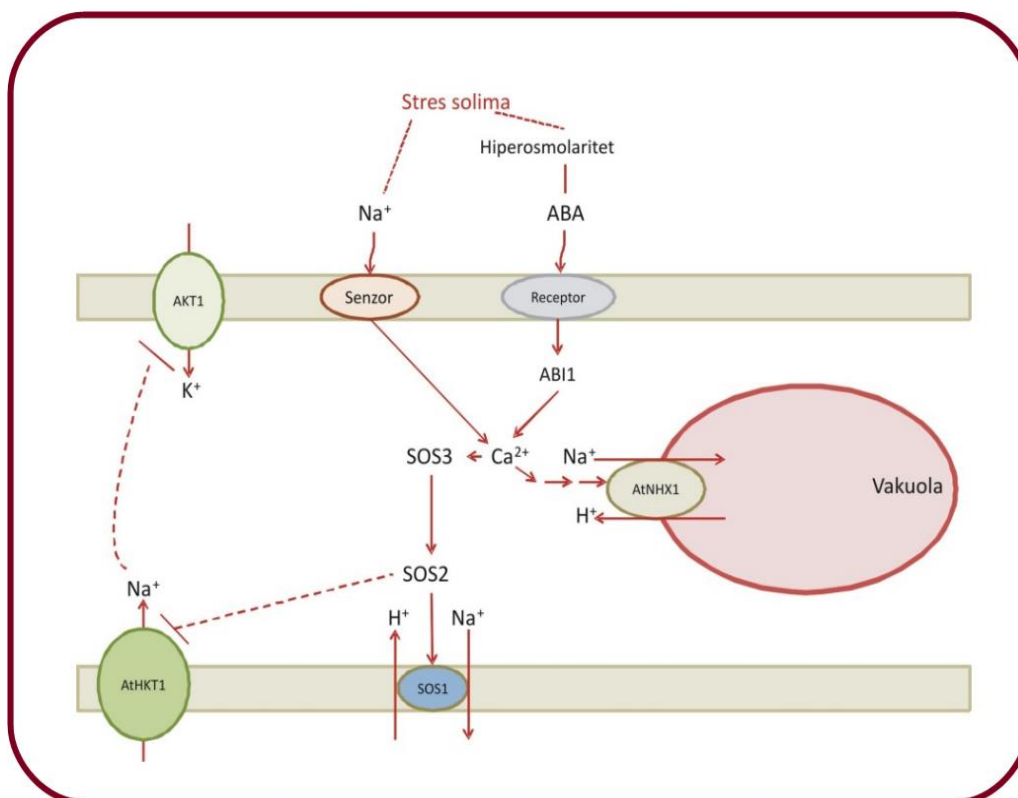


**Slika 9.** Opšta šema tolerancije biljaka na stres solima.

Biljke tokom stresa solima akumuliraju različite osmolite i osmoprotektante, što je i pokazano u velikom broju istraživanja (Pilon-Smits *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Sawahel, 2004; Le & McQueen-Mason, 2006; Galvani, 2007; Parida *et al.*, 2008; Hossain & Fujita, 2010; Li *et al.*, 2011; Ranganayakulu *et al.*, 2013; Shahbaz *et al.*, 2013; Talat *et al.*, 2013; Filippou *et al.*, 2014). Sve osmoprotektante možemo podeliti u tri grupe: amonijum jedinjenja (poliamini, glicinbetain,  $\beta$  alanin betain, dimetil-propionska kiselina), osmoprotektanti koji sadrže aminokiseline – prolin i šećeri i šećerni alkoholi (traheloza, fruktani, manitol, sorbitol) (Singh *et al.*, 2015). Osmoliti predstavljaju male osmotski aktivne molekule koji ne učestvuju u ćelijskom metabolizmu i ne ometaju enzimske reakcije, zbog čega su označeni terminom “kompatibilni sastojci” (Ahn *et al.*, 2011). Osmoliti igraju važnu ulogu i pomažu biljci da opstane u ekstremnim uslovima (Lang, 2007). Oni stabilizuju proteine membrane, a istovremeno smanjuju i osmotski potencijal membrane kako bi se sprečilo isušivanje (gubitak vode) unutar ćelije (Wani *et al.*, 2013).

Jedan od prvih uočenih odgovora biljaka na povišen nivo  $\text{Na}^+$ , a koji se smatra načinom na koji biljke registruju povećanu koncentraciju soli, je unutarćelijsko povećanje koncentracije slobodnog  $\text{Ca}^{2+}$  koji se nalazi u ćeliji. Signal-transdukcioni put koji je vezan za ovaj proces je do sada najbolje ispitan, a poznat je kao SOS („Salt Overly Sensitive“) puttransdukcije signala (Slika 10) (Zhu, 2002). Njegov značaj u otpornosti na visoke koncentracije soli nije razjašnjen u potpunosti, ali se pokazalo da biljke koje su mutanti za ovaj put imaju manju sposobnost tolerancije.

Rađena su istraživanja koja potvrđuju da transmembranske protein kinaze učestvuju u percepciji osmotskog stresa (Urao *et al.*, 1999) i kinaze vezane za ćelijski zid (Kohorn, 2001). Percepcija jonskog stresa, koji je u ovom slučaju izazvan vanćelijskim  $\text{Na}^+$ , vrši se ili na plazma membrani, ili unutar ćelije, nakon prolaska  $\text{Na}^+$  kroz plazma membranu. Prema tome, odgovarajući proteini na plazmamembrani predstavlja senzore. Prilikom percepcije i transdukcije signala dolazi i do stvaranja sekundarnih signala kao što su hormoni (ABA, etilen, citokinini), ROS, intracelularni sekundarni mesendžeri (fosfolipidi i šećeri). Osmotski stres aktivira sintezu ABA, koja dalje reguliše transkripciju *NHX1* gena koji kodira vakuolarni  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  izmenjivač kod *Arabidopsis thaliana* (Shi & Zhu, 2000).



**Slika 10.** Signalni putevi koji regulišu aktivnost jonskih transportera i održavaju niske koncentracije  $\text{Na}^+$  u uslovima stresa solima. Percepcija povećane koncentracije  $\text{Na}^+$  i hiperosmolariteta se odvijaju posredstvom nepoznatih senzora.  $\text{Ca}^{2+}$  zavistan SOS3-SOS2 protein kinazni put posreduje  $\text{Na}^+$  regulaciji ekspresije i aktivnosti  $\text{Na}^+$  transportera. Pretpostavlja se da hiperosmolaritet indukuje sintezu ABA, koja pozitivno reguliše transkripciju *NHX1* i gene drugih transportera za jone. Potencijalna negativna regulacija AtHKT1 od strane SOS3-SOS2, kao i AKT1 od strane intracelularnog  $\text{Na}^+$  je označena isprekidanim linijama. Shema je predstavljena prema Zhu (2003).

Prema ovom modelu, kao odgovor na porast  $\text{Na}^+$  dolazi do porasta količine slobodnog  $\text{Ca}^{2+}$  u citosolu (Zhu, 2002). Pitanje percepcije signala je još uvek otvoreno, ali se pretpostavlja da se vanćelijski natrijum registruje preko membranskog receptora, a unutarćelijski natrijum preko membranskih proteina ili nekog od natrijum osetljivih enzima u citoplazmi.

SOS put se sastoji od tri ključne komponente, gena koji kodiraju specifične proteine i to:

1. SOS3- $\text{Ca}^{2+}$  vezani protein koji deluje kao  $\text{Ca}^{2+}$  protein esencijalan za toleranciju na stres solima,

2. SOS2- $\text{Ca}^{2+}$  zavisna serin/treonin (Ser/Thr) protein kinaza, koji je regulatorni protein esencijalan za toleranciju na stres solima. SOS2 je Ser/Thr protein kinaza sa katalitičkim N-domenom i jedinstvenim C-regulatornim domenom koji sadrži autoinhibitorni FISL motiv (Guo *et al.*, 2001). U normalnim uslovima, katalitički i regulatorni domeni SOS2 reaguju međusobno, i na taj način blokiraju fosforilaciju supstrata.

3. SOS1- plazma membranski  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter koji je uključen u efluks natrijuma i predstavlja takođe jedan od mogućih senzora (Taiz & Zeiger, 2010).

Iako nije poznato koji deo ovog signalnog puta ima ulogu u toleranciji biljaka na stres solima, zna se da je on značajan u nekim aspektima. Dokaz za to su *sos* mutanti *A. thaliana*, koji pokazuju manji stepen tolerancije na stres izazvan solima od divljeg tipa biljaka (Zhu *et al.*, 1998).

Pored opisanog SOS signalnog puta, i drugi signalni putevi su uključeni u percepciju i transdukciju signala, generisanih kao odgovor biljaka na stres solima. Opisani su i SOS4 i SOS5 signalni putevi. SOS4 kodira pirodoksal-kinazu koja je uključena u biosintezu pirodoksal-5-fosfata (PLP), aktivne forme vitamina B6, koji je esencijalni kofaktor za mnoge enzimske reakcije. SOS4 zapravo ima i ulogu kao nova regulatorna komponenta u održavanju homeostaze natrijuma i kalijuma, preko regulacije jonskih kanala i transportera. SOS5 je lokalizovan sa spoljašnje strane membrane i ima funkciju u ćelijskoj adheziji i održavanju integriteta i ekspanzije ćelijskog zida u uslovima stresa (Stikić & Jovanović, 2012).

Nedavno su identifikovane nove komponente signalnih puteva, uključujući novi  $\text{Ca}^{2+}$ -zavisan protein (AnnAt1) koji je povezan sa plazma membranom (Lee *et al.*, 2004), i proteinima apoplasta kod pirinča (OsRMC i DUF26), a koji su uključeni u odgovor na stres izazvan solima (Zhang *et al.*, 2009).

### **1.6.2. Stres solima kod briofita**

Kada su u pitanju briofite, ne postoji puno literaturnih podataka koji se odnose na mehanizme tolerancije na stres izazvan solima. Zna se da na distribuciju briofita u priobalnim zonama u velikoj meri utiče blizina morske obale i izloženost talasima. Generalno mali broj vrsta živi u priobalnom delu, gde je podloga često zapljuskivana

talasima slane vode. Što se više ide ka središtu kopna, uticaj morske vode slabi, pa diverzitet vrsta raste (Bates & Brown, 1975). Smatra se da slana voda ima nepovoljan uticaj na rastenje i razviće briofita (Sabovljević & Sabovljević, 2007). Briofite se generalno smatraju ne-halofitama, iako neke vrste verovatno podnose uticaj soli, mada se razlikuju međusobno u kojoj meri to čine. Postoje podaci da neke vrste jetrenjača roda *Riella* rastu u jezerima sa braktičnom vodom, dok postoje vrste poput *Schistidium maritimum* koje uspevaju da opstanu na stenovitim liticama na atlantskoj obali (Sabovljević & Sabovljević, 2007).

Sa ekofiziološkog stanovišta, sve briofite možemo podeliti na **obligatne, fakultativne i halofite indiferentne** na stanište. Obligatne halofitne briofite rastu isključivo na zaslanjenoj podlozi i zahtevaju prisustvo određene koncentracije soli u podlozi. U ovu kategoriju briofita možemo ubrojati samo vrste roda *Riella*. Fakultativno halofitne briofite su vrste koje mogu opstati na zaslanjenom zemljištu, ali bolje rastu na podlozi bez soli ili gde je prisutna niska koncentracija soli. U ovu grupu spada *Entosthodon hungaricus* koji raste u blizini slanih alkalnih močvara i *Hennediella heimii* koja se često javlja u blizini slanih močvara i oko puteva koji se zimi posipaju solju. Indiferentne vrste mogu da žive na slanim podlogama, ali su dovoljno konkurentne osetljivim vrstama na podlozi bez soli. Ovde se ubrajaju sve briofite evidentirane duž obala severnog Mediterana (Sabovljević & Sabovljević 2007).

Istraživanja rađena na briofitama pokazala su da su znatno tolerantnije na povećanu koncentraciju soli one koje žive bliže obali, nego one koje su daleko od obale (Bates & Brown, 1975). Obalske vrste ne doživljavaju veliku promenu u intracelularnom sadržaju katjona, kao što je to slučaj kod vrsta koje žive dublje u kopnu. Kalijum igra veoma važnu ulogu aktivatora mnogih enzima koji učestvuju u najvažnijim metaboličkim procesima u ćelijama biljaka. Zamena kalijuma natrijumom može dovesti do ozbiljnog narušavanja metabolizma, jer natrijum ne može da zameni kalijum u njegovoj funkciji. Ako bi se vrste koje žive u unutrašnjosti kopna potopile u morsku vodu došlo bi do brzog gubitka kalijuma, što za posledicu ima promenu u propustljivosti ćelijske membrane. Ćelijska membrana postaje znatno propustljivija, jer se kalijumovi joni zamenjuju jonima natrijuma i magnezijuma (Bates & Brown, 1975). Ovakvom zamenom dolazi do disbalansa u odnosu  $K^+/Na^+$ , što direktno ima za



posledicu poremećenu funkciju pumpe za natrijum i kalijum. Kada se ćelije nađu u takvoj situaciji one pokušavaju da izjednače jonski sadržaj unutrašnjosti ćelije sa jonskim sadržajem morske vode. Na ovaj način dolazi do narušavanja funkcije same ćelije (jonski disbalans i promena propustljivosti membrane), što za posledicu ima smanjenje procesa fotosinteze, destrukciju fotosintetičkih pigmenata, smanjenu sintezu proteina, a samim tim i znatno usporen rast.

Bates & Brown (1975) su ispitivali uticaj morske vode i rastvora NaCl na mahovine. Pokazano je da rastvor natrijum-hlorida (NaCl) ima veći štetni uticaj od morske vode, da više narušava ćelijsku membranu i da znatno više utiče negativno na proces fotosinteze. Bates & Brown (1975) primećuju progresivan pad fotosinteze i sinteze proteina, kao i sadržaja hlorofila kod vrsta dublje iz kopna, kao što su: *Grimmia pulvinata*, *Tortella tortuosa*, *Ptychomitrium polyphyllum*, epifitna *Ulota phyllantha*, dok kod vrsta sa obale (*Schistidium maritimum* i *Tortella flavovirens*) nije primećen značajan pad fotosinteze, sinteze proteina i sadržaja hlorofila. Vrste koje žive bliže obali zadržavaju znatno duže mogućnost fotosinteze čak i nakon 12 sati.

Mehanizmi tolerancije na povećanu koncentraciju soli kod mahovina uglavnom nisu istraženi. Pretpostavlja se da se soli i voda koncentrišu u vakuoli da bi citoplazma održavala nizak jonski balans. Neke briofite (npr. *Aloina sp.*) imaju sukulentsku građu, kao vid adaptacije na uslove sredine u kojoj žive. Način izlučivanja soli prisutan kod vaskularnih biljaka nije do sada zabeležen kod briofita. Briofite koje su tolerantne na stres solima nemaju posebne regulatorne mehanizme, njihova tolerancija se zasniva na skraćivanju životnog ciklusa, tako da se praktično poklapa period mirovanja sa periodom najveće suše tokom godine. Sušni periodi direktno povećavaju i koncentraciju soli u podlozi. Obzirom da briofite nemaju korenov sistem, kod njih se ne javlja mehanizam sprečavanja ulaska soli u koren, ali je moguće da postoje jonske pumpe u drugim delovima biljke koje vrše filtraciju soli (Sabovljević & Sabovljević, 2007).

Za razliku od vaskularnih biljaka koje su tokom evolucije izgradile različite mehanizme odbrane od abiotičkog stresa, mahovine na stres reaguju brzim odgovorima na ćelijskom nivou, zbog specifičnog načina života i građe. Usvajanje jona i njihova kompartmentizacija u vakuolama su veoma važni procesi za rastenje i razviće biljaka, kako u optimalnim, tako i u stresnim uslovima. Međutim, visoke koncentracije jona  $\text{Na}^+$



i  $\text{Cl}^-$  utiču na termodinamičku ravnotežu i uzrokuju hiperosmotski stres, jonski disbalans i jonsku toksičnost. Stoga je za biljke veoma bitno da ponovno uspostave jonsku homeostazu u uslovima povećane koncentracije soli. Odgovor i tolerancija briofita na osmotski i jonski stres se zasniva na procesima transdukcije signala, regulacije transkripcije, jonske i osmotske homeostaze i biosinteze odbrambenih proteina koji su uključeni u određenu vrstu stresa (Wang *et al.*, 2008a).

Frank i saradnici (2005) su ispitivali uticaj NaCl na toleranciju model briofite *P. patens*. Ako bi se uporedila tolerantnost ove vrste mahovina sa drugim model biljkama (npr. *A. thaliana*), *P. patens* pokazuje visok stepen tolerancije na soli, a samim tim i na abiotički stres. Kod *A. thaliana* koncentracije NaCl iznad 100 mM ozbiljno narušavaju procese rastenja i razvika biljke, dok je za *P. patens* ustanovljeno da toleriše koncentracije do 350 mM soli (NaCl). U eksperimentima gde je praćen uticaj soli na rastenje *P. patens* do koncentracije 350 mM NaCl nije primećeno izbeljivanje filoida, dok na višim koncentracijama dolazi do potpunog izbeljivanja i biljke nisu sposobne da vrše proces fotosinteze. Ovakvi rezultati se odnose na trenutno izlaganje biljke visokim koncentracijama soli. Međutim, ako se biljke postepeno izlažu različitim koncentracijama soli, one mogu da rastu i tolerišu i vrlo visok nivo soli (čak do 600 mM NaCl) (Benito & Rodriguez-Navarro, 2003). Tolerancija ovako visoke koncentracije soli se povezuje sa aktivnošću i prisustvom  $\text{Na}^+$  ATP-azne pumpe, koja se inače ne nalazi kod cvetnica i za koju se smatra da se izgubila kod kopnenih biljaka tokom procesa evolucije (Frank *et al.*, 2005).

Briofite kao i vaskularne biljke proizvode različite neenzimske i enzimске komponente kako bi se prilagodile ili odbranile od stresnih uslova. U zavisnosti od vrste i dužine trajanja stresa, sadržaj akumuliranih jedinjenja je različit, kao što je različita i aktivnost enzima. Zapaženo je da se usled stresa solima, kod *P. patens* u većoj meri akumuliraju solubilni šećeri, što ukazuje da oni imaju glavnu ulogu u održavanju osmolarnosti ćelija kod mahovina (Watanabe *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008b).

Analize na molekularnom nivou su pokazale da briofite poseduju mnogobrojne signalne i regulatorne komponente, među kojima su i proteini fototropin, Mcamb-1 (kalmodulin vezujući protein), MCamb2, mijelin („myelin basic protein kinase-MBP“)

14-3-3 protein (regulatorni protein), PpDBF1 (*P. patens* DBF1) i PpDBF2 (*P. patens* DBF2) (Liu *et al.*, Wang *et al.*, 2008a).

Fototropin je receptor plave svetlosti koji kod viših biljaka posreduje u fototropizmu, relokaciji hloroplasta i otvaranju stoma. Kod mahovine, *P. patens* fototropin i 14-3-3 protein kooperativno učestvuju u regulaciji H<sup>+</sup>-ATP-aze plazma membrane i održavanju jonske homeostaze, što je u uslovima stresa solima neophodno (Wang *et al.*, 2005; 2008a). Protein 14-3-3 je važan regulatorni protein eukariota (Wu *et al.*, 1997; 2008a), koji je uključen u regulaciji i kinaza i fosfataza (Wang *et al.*, 2008b). Kinaze igraju centralnu ulogu u transdukciji signala pri izloženosti biljaka uslovima stresa. Kod vrste *F. hygrometrica*, slani stres aktivira kinazu-MBP (Souza & Johri, 2002; Wang *et al.*, 2008a).

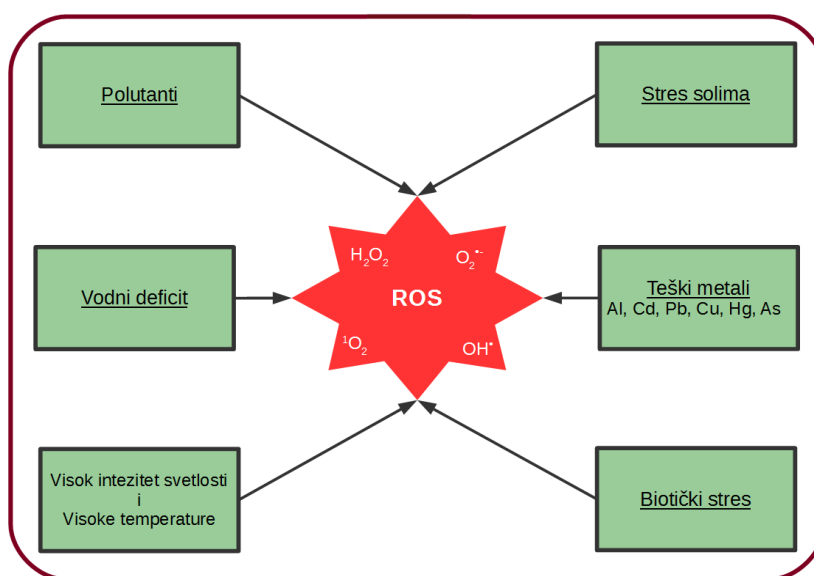
Kao što je pomenuto, jedan od efekata osmotskog stresa je denaturacija proteina i smanjenje njihove aktivnosti. Abiotički stres dovodi do oštećenja krucijalnih proteina za funkcionisanje ćelija. Kod *P. patens* HSP70 je odgovoran za zaštitu proteina od degradacije i denaturacije tokom stresa solima (Wang *et al.*, 2008a). Pored toga, stvaranje ROS dodatno oštećuje makromolekule u ćelijama i povećava negativan uticaj stresnih faktora. Usled stresnih faktora dolazi do poremećaja u homeostazi ćelije i povećane produkcije ROS koji reaguju sa membranama, proteinima i nukleinskim kiselinama, izazivajući njihova oštećenja. Zaštitini proteini koji se sintetišu prilikom stresa solima su: akvaporini, šaperoni, enzimi za sintezu osmolita i detoksikaciju ROS-a i LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteini (Bray, 1997).

Analogno SOS („Salt Overly Sensitive“) signalnom putu kod *A. thaliana*, koji učestvuje u isključivanju viška Na<sup>+</sup> iz ćelija, i kod mahovina se vrši efluks jona Na<sup>+</sup> kroz Na<sup>+</sup>-ATP-azu i H<sup>+</sup>-ATP-azu, a povećava se influks K<sup>+</sup>, kako bi se povratila ravnoteža između ova dva jona. Kanali za Cl<sup>-</sup> sprečavaju ulazak jona u ćelije, kao i ABC transporteri, i doprinose regulaciji homeostaze kod mahovina (Wang *et al.*, 2008a). Jonska ravnoteža mahovina je zavisna od aktivnosti membranskih proteina koji su odgovorni za transport jona. To su: Na<sup>+</sup>-ATP-aza (PpENA1 i PpENA2 kod *P. patens*), vakuolarna H<sup>+</sup>-ATP-aza (PpSHP1 i PpSHP2), jonski kanali za Cl<sup>-</sup> i ABC transporteri (Liu *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2008a).

## 1.7. Oksidativni stres

Molekularni kiseonik je esencijalni element za aerobni način života, ali može biti i veoma toksičan ako se javlja u obliku reaktivnih kiseoničnih vrsta. Pored direktnog uticaja povećane koncentracije soli na biljku, stres solima dovodi i do oksidativnog stresa pri čemu se nagomilavaju toksične forme kiseonika kao što su singlet kiseonik ( $^1\text{O}_2$ ), superoksid anjon radikal ( $\text{O}_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $\bullet\text{OH}$ ), kao i vodonik peroksid (Parida & Das, 2005; Ahmad & Sharma, 2008; Ahmad *et al.*, 2010). Reaktivne kiseonične vrste mogu da izazovu nekontrolisanu oksidaciju i destrukciju različitih komponenata u ćeliji i na taj način ometaju odvijanje normalnih fizioloških procesa u samoj ćeliji. Mesta najveće sinteze ROS u uslovima svetla su hloroplasti i peroksizomi (Foyer *et al.*, 2003), a u uslovima mraka su mitohondrije (Moller, 2001). Oksidativni stres predstavlja sekundarni stres, izazvan nekim primarnim stresogenim faktorom (Slater *et al.*, 2008).

Oštećenja uzrokovana slobodnim radikalima, jedna su od najvažnijih štetnih činilaca u biološkim sistemima izloženim različitim oblicima stresa kao što su suša, ekstremne temperature, visok intenzitet svetlosti, zaslanjenost tla, izloženost ozonu, primena herbicida, kao i napad patogena (Slika 11). Vodni deficit i stres solima su uvek praćeni oksidativnim stresom koji se javlja usled remećenja elektron-transportnog lanca, što direktno dovodi do stvaranja ROS formi.



**Slika 11.** Stresogeni faktori koji dovode do nastanka ROS formi.

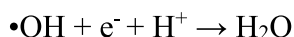
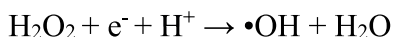
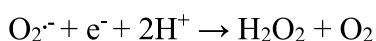
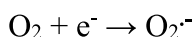
### 1.7.1. Oksidativni stres kod biljaka

Atmosferski kiseonik u svom osnovnom stanju ima dva nesparena elektrona, sa paralelnim spinovima, tako da kiseonik nije reaktivan u odnosu na većinu organskih jedinjenja. Najčešći mehanizam redukcije kiseonika u biohemijskim reakcijama povezan je sa prenošenjem jednog elektrona, što znači da molekul kiseonika mora da se aktivira pre nego što se uključi u reakcije sa organskim molekulima.

Aktivacija kiseonika se odvija na dva načina:

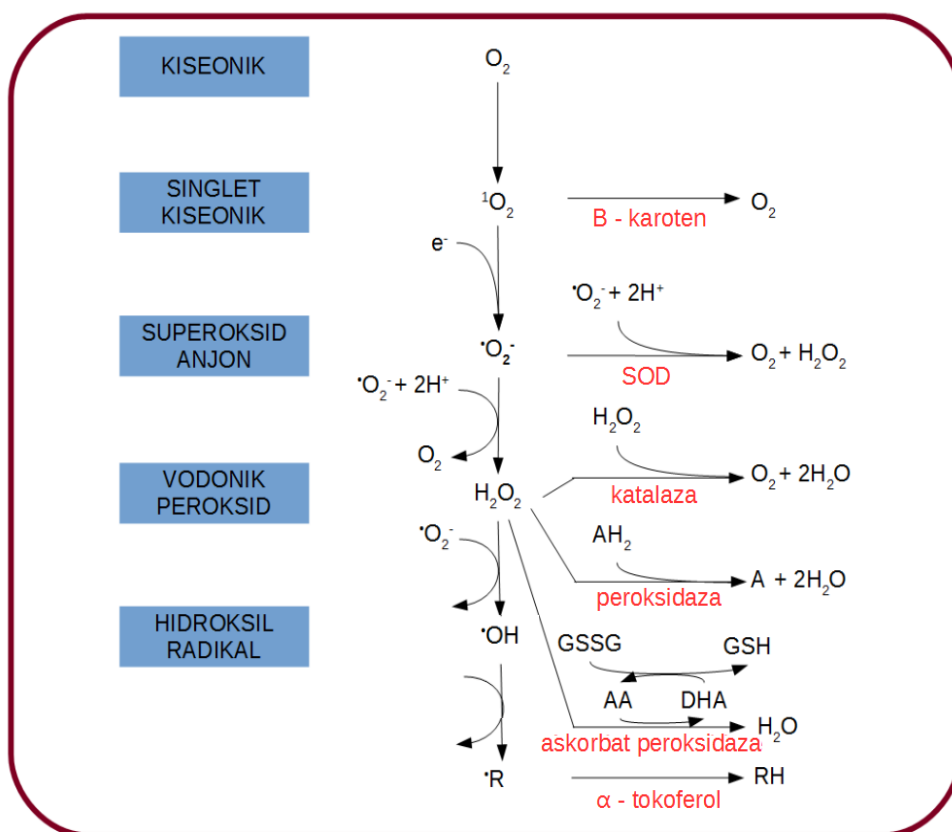
**I mehanizam** - apsorpcijom određene količine energije, koja je potrebna da promeni spin jednog od nesparenih elektrona, na taj način molekul kiseonika se prevodi u singlet stanje ( $^1\text{O}_2$ ) u kome elektroni imaju suprotne spinove. Kod biljaka dolazi do čestog formiranja singlet kiseonika u fotosistemima, a osnovna metabolička uloga ovog reaktivnog molekula povezana je sa oksidacijom ksenobiotika, kao i sa polimerizacijom lignina (Živković, 2011). Takođe može nastati i kao posledica stresa kod biljaka (Slater *et al.*, 2008).

**II mehanizam** - predstavlja postepen proces, monovalentne redukcije kiseonika. Na ovaj način nastaje superoksid anjon radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), kao i hidroksil radikal ( $\cdot\text{OH}$ ).



Superoksid anjon radikal je moćan oksido-reduktant koji može da oksiduje sumpor, askorbinsku kiselinu ili NADPH, ali i da redukuje citohrom c i jone metala. Reakcija u kojoj nastaje  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2$ , obično je katalizovana enzimom superoksid dismutazom (SOD). Dobijeni vodonik peroksid je supstrat za veliki broj reakcija, kao što je sinteza složenih organskih jedinjenja, koju katalizuje enzim peroksidaza (POD). Reaktivnost vodonik peroksida može da deaktivira brojne enzime iz Kalvinovog ciklusa (Charles & Halliwell, 1980), a samo formiranje vodonik peroksida u biološkim

sistemima počinje dismutacijom superoksida. Da bi se uklonili molekuli vodonik peroksida i superoksid anjon radikala aktivne su i enzimske i neenzimske komponente (Slika 12). Za uklanjanje hidroksilnog radikala i singlet kiseonika koriste se samo niskomolekulski antioksidansi, jer ne postoje enzimi za njihovo uklanjanje (Papadakis & Roubelakis–Angelakis, 2002). U tilakoidima hloroplasta superoksidni anjon radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) i  $H_2O_2$  se uklanjaju u ciklusu voda - voda (Asada, 1999). Alternativne oksidaze (AOX) takođe redukuju produkciju  $O_2^{\cdot-}$  u tilakoidima. ROSkoji napuštaju tilakoide i/ili se proizvode u stromi hloroplasta, uklanja se pomoću enzima SOD i u askorbat – glutationskom ciklusu.



**Slika 12.** Formiranje ROS i antioksidativni sistemi koji učestvuju u njihovom uklanjanju (enzimi i antioksidanti). Modifikovano prema Slater *et al.*, 2008.

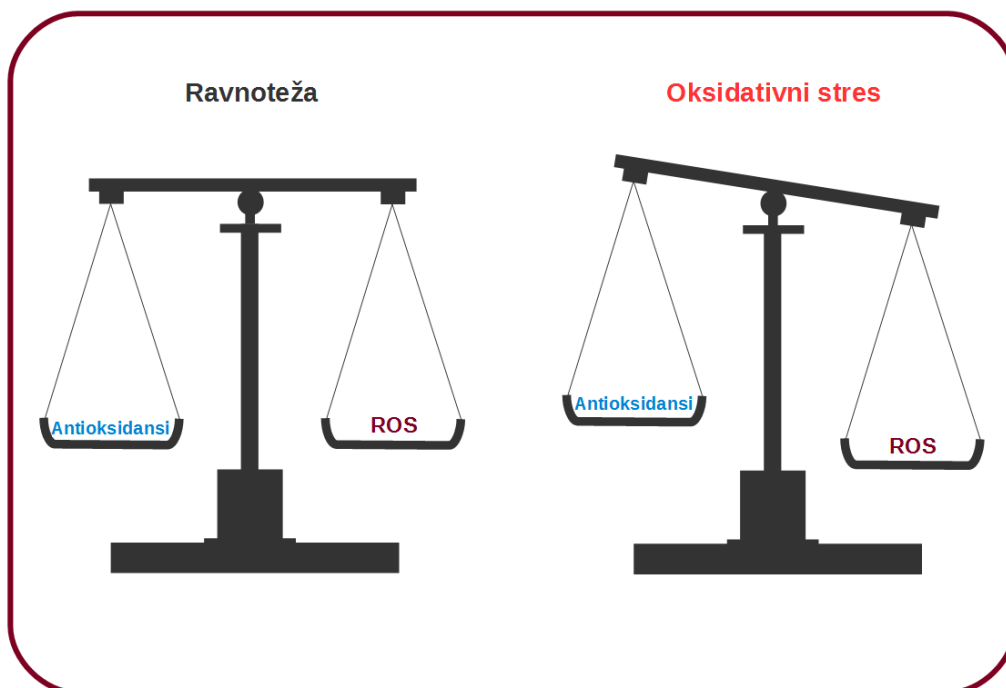
Postoje tri predložena mehanizma nastanka oštećenja ćelija koja su indukovana reaktivnim vrstama kiseonika:

1. Interakcija slobodnih radikala sa biološkim strukturama, pri čemu nastaju kovalentne modifikacije makromolekula, a prvenstveno proteina i nukleinskih kiselina;

2. Promene nastale kao posledica razaranja membranskih lipida u procesu lipidne peroksidacije;

3. Formiranje neradikalских produkata koji specifično napadaju različite ciljeve u ćeliji.

ROS forme su neizbežni produkti aerobnog metabolizma (Asada & Takahashi, 1987) i nastaju tokom procesa fotosinteze i respiracije. Hloroplasti, mitohondrije i plazma membrane su povezani sa elektron-transportnim sistemom i to su ključna mesta za generisanje ROS, kao nusproizvoda metabolizma kiseonika (Gill & Tuteja, 2010). Fotosistemi I i II u hloroplastima su glavna mesta produkcije singlet kiseonika i superoksid anjon radikala (Foyer & Noctor, 2005), a u mitohondrijama dolazi do stvaranja superoksid anjon radikala. Kiseonične vrste mogu nastati i u citosolu, kao i u endoplazmatičnom retikulumu tokom detoksifikacije (Dybing *et al.*, 1976). U uslovima stresa dolazi do disbalansa između produkcije i uklanjanja reaktivnih formi kiseonika, zapravo produkcija ROS nadmašuje odbrambene antioksidativne kapacitete i kada njihova koncentracija prevaziđe fiziološki prihvatljivivo, smatra se da je ćelija u stanju oksidativnog stresa (Slika 13) (Gill & Tuteja, 2010).



**Slika 13.** Odnos između oksidativnih i antioksidativnih procesa u uslovima odsustva i prisustva stresa (Modifikovano prema Gill & Tuteja, 2010).

Sa druge strane ROS forme mogu delovati i kao sekundarni glasnici ili signalni molekuli koji indukuju sintezu odbrambenih proteina (Cruzde Carvalho *et al.*, 2012). Mnoga istraživanja pokazuju da ROS forme imaju značaj u procesu klijanja semena, tj. prelaska semena iz faze mirovanja u metabolički aktivnu fazu (Hite *et al.*, 1999; Bailly *et al.*, 2002; Wojtyla *et al.*, 2006). Neke kiseonične forme kao što je vodonik peroksid nastaju u biljkama, kao rezultat normalnog metabolizma (Papadakis & Roubelakis-Angelakis, 2002). Molekul vodonik peroksida može direktno ili indirektno da učestvuje u odbrambenim mehanizmima kod biljaka, kao i u prenosu signala (Yoshioka *et al.*, 2001; Vranova *et al.*, 2002). Uloga vodonik peroksida u ćelijskoj signalizaciji ogleda se u aktivaciji signalnog puta u kome učestvuje enzim NAD(P)H oksidaza. Signalni put vodonik peroksida i NAD(P)H oksidaze detaljno je proučen u genomu *A. thaliana* (Keller *et al.*, 1998).

Aktivne forme kiseonika su sposobne da reaguju sa svim tipovima biomolekula i da dovode do destrukcije ćelije (Asada & Takahashi, 1987; Halliwell & Gutteridge, 1989; Hammond-Kosack & Jones, 1996; Asada, 1999; Dat *et al.*, 2000; Grassmann *et al.*, 2002). ROS forme mogu da uzrokuju različita oštećenja kao što su lipidna peroksidacija, mutacije na molekulu DNK, destrukcija hlorofila, inaktivacija enzima, oksidacije pojedinih aminokiselina što oštećene proteine čini podložne proteolitičkoj degradaciji (Devies, 1987; Bindoli, 1988; Simonović, 2011). Regulacija ROS nivoa u ćeliji je jako važna kako bi se izbegla oksidativna oštećenja ćelije i kako bi se sprečio toksičan efekat slobodnih radikala (Halliwell & Gutteridge, 1989). U normalnim uslovima produkcija ROS u ćeliji je  $240 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$  i  $0.5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  u hloroplastima, dok u stresnim uslovima koncentracija  $\text{O}_2^-$  raste do  $720 \mu\text{M s}^{-1}$ , a  $\text{H}_2\text{O}_2$  do 5-15  $\mu\text{M}$  (Polle, 2001).

U stresnim uslovima i kod briofita dolazi do pojave oksidativnog stresa. Kao i kod drugih biljaka oksidativni stres ima negativan uticaj na fiziološke procese u ćeliji. Briofite, kao i vaskularne biljke poseduju neenzimske i enzimske komponente koje štite ćeliju od negativnog uticaja oksidativnog stresa.

## 1.8. Antioksidativni sistem kod biljaka

Najšire prihvaćena definicija bioloških antioksidanata jeste ona koju je dao Halliwell (1989), a prema kojoj su antioksidanti “supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata”. Antioksidanti mogu ispoljavati svoju aktivnost različitim mehanizmima zahvaljujući njihovoj sposobnosti da deluju kao:

- “hvatači” (skevindžer) slodobnih radikala,
- donori elektrona ili
- donori H-atoma.

Hloroplasti, mitohondrije i peroksizomi su glavne organele u kojima se nalaze antioksidativni sistemi biljne ćelije. U sprečavanju nagomilavanja štetnih ROS formi učestvuju neenzimske komponente antioksidativnog sistema (askorbinska kiselina - vitamin C, glutathion,  $\alpha$ - tokoferol - vitamin E,  $\beta$  karoten - provitamin A, zeaksantin, flavonoidi, fenolna jedinjenja, šećeri) (Nanjo *et al.*, 1999., Gill *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2012), kao i enzimске komponente antioksidativnog sistema koga čine SOD, glutathion reduktaze - GR, katalaze - CAT, askorbat peroksidaze - APX, monodehidroaskorbat reduktaze - MDHAR, gvajakol peroksidaze - GPOD (Kramer, 1995; Noctor & Foyer 1998; Jimenez *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008a). Ravnoteža između SOD i APX ili CAT je od ključnog značaja za održavanje nivoa superoksid anjon radikala i vodonik peroksida u ćeliji (Bowler *et al.*, 1991). Biljke koje imaju smanjenu proizvodnju (APX), povećavaju produkciju SOD, CAT i GR, dok kod biljaka koje proizvode manje CAT, povećava se produkcija APX i GPX (Willekens *et al.*, 1997; Rizhsky *et al.*, 2002).

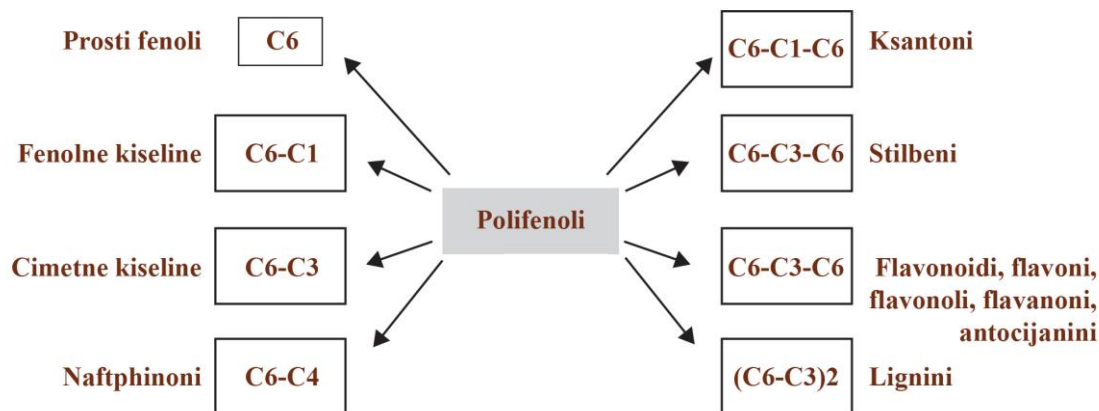
### 1.8.1. Neenzimske komponente odbrane od stresa

**Fenolna jedinjenja** - predstavljaju veliku grupu sekundarnih metabolita koji se u biljkama sintetišu na različitim mestima i u različitim fazama rastenja i razvicia biljaka. Kod različitih biljnih vrsta sastav i količina fenolnih jedinjenja variraju. Količina fenolnih jedinjenja nije ista u svim delovima biljke, što zavisi od prirode



biljnog tkiva, a i potreba biljke za sintezom ovih jedinjenja. U svom sastavu fenoli imaju bar jedan aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa (Sakihama, *et al.*, 2002). Najčešće pominjane i ispitivane osobine fenolnih jedinjenja su njihova antioksidativna aktivnost i alelopatki efekat ovih jedinjenja u interakciji različitih biljnih vrsta. Smatra se da je izražena antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja rezultat njihove sposobnosti da budu donori vodonikovih atoma i da pri tome uklanjaju slobodne radikale koji su štetni za biljnu ćeliju i njeno pravilno funkcionisanje, uz formiranje manje reaktivnih fenoksil radikala. Nastali fenoksil radikali su stabilniji zbog delokalizacije elektrona i postojanja više rezonantnih formi. Fenoli imaju važnu ulogu i kao alelohemikalije i značajno je njihovo istraživanje međusobim interakcijama između biljaka.

Na Slici 14 je predstavljena podela fenolnih jedinjenja na osnovu broja konstitutivnih ugljenikovih atoma osnovnog skeleta fenola. Sve fenole možemo grupisati u: **prosti fenoli, fenolne kiseline, cimetne kiseline, ksantoni, stilbeni, naftohinoni, lignini i flavonoidi**.



**Slika 14.** Klasifikacija fenolnih jedinjenja na osnovu broja konstitutivnih ugljenikovih atoma osnovnog skeleta fenola (prema Boros *et al.*, 2010).

Najvažniji put biosinteze fenolnih jedinjenja kod viših biljaka je geranil fenilpropanoidni biosintetski put tj. ciklus šikimske kiseline. U geranil fenilpropanoidnom biosintetskom putu nastaju aromatične aminokiseline: fenilalanin, tirozin i triptofan. Sve tri aminokiseline su prekursori mnogih sekundarnih metabolita.

Njihova sinteza se aktivira endogeno u toku razvića, ali može biti pokrenuta i različitim egzogenim faktorima (Lim *et al.*, 2012). Fenolna jedinjenja deluju kao signalni molekuli i učestvuju u zaštiti biljaka od patogena, UV zračenja i i/ili uklanjanju slobodnih radikala iz ćelija, koji nastaju u toku oksidativnog stresa. Stoga se može pratiti njihov sadržaj u biljkama koje su izlagane stresu solima i dobijeni rezultati mogu ukazati na mehanizam tolerancije koji određena vrsta koristi u toku stresa.

Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja se zasniva na direktnoj reakciji fenola i slobodnih radikala. Ovaj proces se na molekularnom nivou može odvijati preko tri mehanizma:

**I mehanizam** uklanjanja slobodnih radikala ( $R^\cdot$ ) zasniva se na homolitičkom cepanju O-H grupe i prenosu vodonikovog atoma sa fenolnog jedinjenja ( $Ar-OH$ ) na slobodni radikal.

**II mehanizam** se zasniva na prenosu elektrona sa fenolnog jedinjenja i tada nastaje katjonski radikal ( $ArOH^+$ ) i anjon ( $R^-$ ).

**III mehanizam** se bazira na sposobnosti fenolnih jedinjenja da vezuju za sebe metale, formirajući stabilne komplekse, čime se sprečava učešće metala u reakcijama u kojima se proizvode slobodni radikali i na taj način se ćelija štiti.

**Prolin** se akumulira u značajnoj meri prilikom odgovora velikog broja organizama na (eubakterije, protozoe, morski beskičmenjaci, biljke) na različite abiotičke i biotičke stresne uslove sredine u kojoj se nalaze (Ashraf, 1994; Saradhi, *et al.*, 1995; Hare & Cress 1997; Ali *et al.*, 1999; Ozturk & Demir, 2002; Siripornadulsil *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2003; Kavi Kishore *et al.*, 2005; Ashraf & Foolad, 2007).

Metabolizam i akumulacija prolina su najčešće proučavani kod osmotskog stresa biljaka (Verbruggen & Hermans, 2008). Kao odgovor na sušu ili stres izazvan solima dolazi do akumulacije prolina u citosolu, gde ova amino kiselina značajno doprinosi citoplazmatskom osmotskom podešavanju (Leigh *et al.*, 1981; Binzel *et al.*, 1987; Ketchum *et al.*, 1991). Akumulacija prolina je posledica *de novo* sinteze (Rhodes *et al.*, 2002). Prekursor sinteze prolina je L-glutaminska kiselina i to je glavni put sinteze prolina. Enzimi pirolin-5-karboksilat sintetaza (P5CS) i pirolin-5-karboksilat reduktaza (P5CR) imaju glavne uloge u biosintetskom putu prolina (Delauney & Verma, 1993).

Stimulacija biosinteze prolina u uslovima stresa solima i vodnog stresa se povezuje sa povećanjem količine (P5CS) i odgovarajuće mRNA (Savoure *et al.*, 1995). Drugi put biosinteze može da se dešava preko alternativnog prekursora ornitina (Orn), koji transaminacijom može preći u pirolin-5-karboksilat (P5C) dejstvom ornitin  $\delta$ -transferaze.

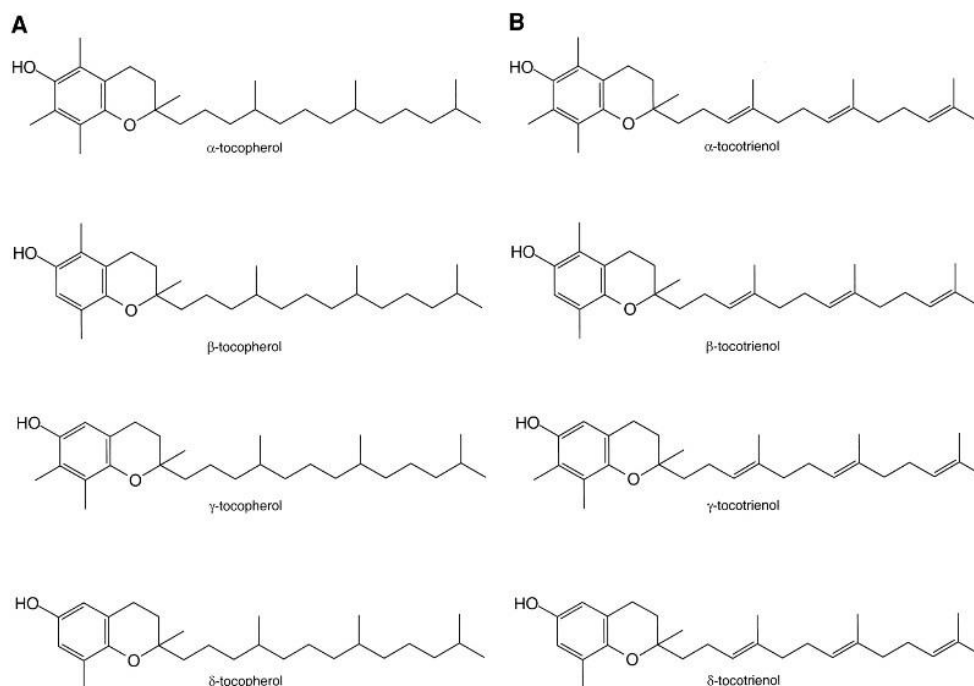
Pojedine studije su pokazale da prolin predstavlja akceptor za ROS (Smirnov & Cumbes, 1989). On je značajna komponenta u zaštiti ćelijske membrane od oksidativnog stresa indukovano stresom solima, jer pojačava sintezu različitih antioksidanata (Okuma *et al.*, 2000). Prolini stabilizuju strukturu proteina i njihova povećana akumulacija utiče na redoks balans u ćeliji (Maggio *et al.*, 2002). Jako su bitni i za održavanje odnosa  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  (Hare & Cress, 1997). Pored toga, pokazano je da prolin indukuje ekspresiju gena uključenih u odgovor na stres solima, i to onih koji poseduju prolin odgovorne elemente u svojim promotorima (Satoh *et al.*, 2002; Oono *et al.*, 2003; Chinnusamy *et al.*, 2005).

Nivo akumuliranog prolina varira od vrste do vrste, a prilikom stresnih uslova koncentracija mu se može povećati i 100 puta u odnosu na kontrolnu grupu biljaka (Verbruggen & Hermans, 2008). Koncentracija prolina koja se akumulira veća je kod genotipova tolerantnih na stres nego kod osetljivih genotipova. Međutim, bez obzira na činjenicu da postoji jaka korelacija između stepena tolerantnosti biljaka na stres i akumulacije prolina, ovaj odnos nije univerzalan.

Usled osmotskog stresa kod biljaka *A. thaliana* se akumuliraju znatne količine prolina (Verbruggen, *et al.*, 1993; Yoshida, *et al.*, 1997). Tokom stresa ekspresija *P5CS*, ali ne i *P5CR*, je u korelaciji sa sadržajem prolina (Savoure *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1995). Transgene biljke *A. thaliana* sa antisens prolin dehidrogenaznom cDNA pokazuje pojačanu akumulaciju prolina, kao i porast stepena tolerantnosti na niske temperature i salinitet (Nanjo *et al.*, 2003). S druge strane, prolin-deficijentni mutanti *A. thaliana* nisu bili u stanju da nastave rast na medijumu sa povećanim salinitetom, usled toga što nisu akumulirali prolin u meri u kojoj je to primećeno kod divljeg tipa (Werner & Finkelstein, 1995).

Nakon prestanka dejstva stresora dolazi do brze razgradnje prolina, što može obezbediti dovoljno redukujućih agenasa za oksidativnu fosforilaciju u mitohondrijama i za obezbeđivanje ATP-a za oporavak od stresa (Hare & Cress, 1998; Hare *et al.*, 1998). Mnogi eksperimenti pokazuju da egzogeno dodat prolin povećava otpornost biljaka na stresne faktore (Ashraf & Foolad, 2007). Egzogeno primenjen prolin doprinosi osmoregulaciji, ali i boljem rastanju biljaka (Csonka & Hanson, 1991).

**Vitamin E** - Količina tokoferola, kao i odnos pojedinih tipova tokoferola varira od biljke do biljke, kao i od organa do organa. Najniži nivo tokoferola je u krtoli krompira (<1 µg/g suve mase), a nivo u listovima nekih biljaka može dostići i >1 mg/g suve mase (Munne-Bosch & Alegre, 2002). Sva jedinjenja vitamina E su grupisana u tokoferole i tokotrienole (Slika 15).



**Slika 15.** Struktura različitih tipova tokoferola i tokotrienola.

Tokoferoli se od tokotrienola razlikuju samo u nivou zasićenja repa, a razlika između α, β, γ i δ tokoferola je samo u broju i položaju metil supstituenata na prstenu (Grusak & DellaPenna, 1999). Jedna od bitnijih uloga tokoferola jeste da u interakciji sa drugim antioksidansima smanjuje nivo ROS u ćeliji i održava optimalan redoks nivo u hloroplastima. Nivo tokoferola se značajno smanjuje kada se biljka nađe u uslovima stresa (Munne-Bosch & Alegre, 2002). Novija istraživanja su pokazala da nije

neophodan visok nivo tokoferola da bi biljke rasle u optimalnim uslovima. Snižena koncentracija tokoferola dovodi samo do blagog porasta podložnosti biljke za fotooksidaciju (Porfirova *et al.*, 2002; Kanwischer *et al.*, 2005).

Pokazana je uzajamna interakcija  $\alpha$  tokoferola i karotenoida u zaštiti fotosistema II kod *Chlamydomonas reinhardtii* koji je bio izložen herbicidima (Trebst *et al.*, 2002; Trebst, 2003).

**Šećeri** su glavni izvor ugljenika i energije za žive organizme. U glavnom anaboličkom procesu na zemlji, fotosintezi, uz pomoć sunčeve svetlosti i ugljenika, proizvode se šećeri koji su neophodni za rastenje i razviće biljaka.

Mnoga istraživanja pokazuju da šećeri imaju bitnu ulogu kao signalni molekuli u procesu percepcije i transdukcije signala u uslovima stresa (Xiao *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2006). Koncentracija šećera se drastično menja tokom razvića i kao odgovor na sredinske faktore, kao što su fotoperiod, abiotički i biotički stres (Roitch, 1999; Smith *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2005). Biljke tokom procesa rastenja i razvića poseduju senzorne sisteme koji mogu detektovati promenu nivoa dostupnih šećera (Koch, 1996). U interakciji molekula šećera i senzornih proteina dolazi do generisanja signala nakon čega se dešava transdukcija signala, a kao krajnji rezultat toga jeste ćelijski odgovor (Smeekens, 2000). Ćelijski odgovor (smanjena ili povećana ekspresija gena, kao i smanjena ili povećana aktivnost enzima) je različit u različitim situacijama, što zavisi od velikog broja faktora. Svaki prirodni šećer ili bilo koji intermedijer glikolize može biti signalni molekul, a to je do sada potvrđeno za saharozu, heksoze i trahelozu (Smeekens, 2000; Arroyo *et al.*, 2003).

Glavni, tj. primarni oblik šećera koji se stvara tokom procesa fotosinteze jeste saharoza, koja predstavlja i glavni transportni oblik šećera (Turgeon, 1989). Saharozam može da ima funkciju signalnog molekula, jer daje informaciju o energetsom statusu biljke. Osim toga, saharoza reguliše ekspresiju fotosintetičkih gena i dovodi do njihove represije (Smeekens, 2000; Rolland *et al.*, 2002).

Kada su u pitanju heksozni šećeri, dominantan među njima je glukoza, koja učestvuje u regulaciji genske ekspresije kod biljaka. Pokazano je da glukoza vrši represiju fotosinteze i klijanja semena kod velikog broja vrsta (Rolland *et al.*, 2002).

Fosforilacija glukoze se može odvijati na dva načina: nespecifičan put – posredstvom heksokinaza (HXK) ili specifičan put - posredstvom glukokinaza. Osim glukoze, fosforilaciji podležu i fruktoza i galaktoza. Ovi šećeri posreduju u transdukciji signala koji su generisani glukozom. Ove heksoze su takođe uključene u represiju gena za fotosintezu ili glioksalatni ciklus (Jang *et al.*, 1994).

Mehanizmi koji stoje iza senzorne i signalne uloge šećera su dosta komplikovani, pre svega zbog ukrštanja signalnih puteva šećera sa signalnim putevima biljnih hormona. Posebno su uočljivi ukrštanje signala puteva šećera sa signalnim putevima ABA i etilenom (Leon & Sheen, 2003). Glukoza aktivira sintezu ABA, pri čemu su signalne uloge ABA i glukoze u antagonizmu sa signalnim putem etilena. Šećeri mogu aktivirati i neke gene koji su uključeni u odbrani biljaka od stresa. Mnogi abiotički i biotički faktori mogu poremetiti metabolizam šećera koji postoji u optimalnim uslovima (Tomashow, 2001).

Tokom osmotskog stresa i suše dolazi do pojačane aktivnosti saharazo-fosfat-sintetaze (SPS), kao i saharozo sintaze (SS). Heksoze, kao signalni molekuli mogu imati značajnu ulogu u odbrani biljaka od vodnog deficita i osmotskog stresa. Heksoze povećavaju osmotski pritisak u samoj ćeliji i na taj način predstavljaju vid odbrane u uslovima stresa solima i vodnog deficita. Kod mnogih biljnih vrsta pokazana je pojačana aktivnost i produkcija saharoze prilikom stresa solima (Balibrea *et al.*, 2000; Khelil *et al.*, 2007).

### 1.8.2. Enzimske komponente odbrane biljaka od stresa

U tabeli (Tabela 1) su prikazani glavni antioksidativni enzimi koji uklanjaju ROS u biljnim ćelijama, kao i glavni mehanizmi nastanka ROS i lokalizacija nastanka.

**Tabela 1.** Proizvodnja i uklanjanje ROS u biljkama (prema Mittler, 2002) A – apoplast; C – citoplazma; ĆZ– ćelijski zid; H – hloroplast; M – mitohondrija; Me – membrane; P – peroksizom; PM – plazmalema; PS – fotosistem; ROS; TE – transport elektrona; V - vakuola.

| Mehanizam                                            | Lokacija      | ROS                       | Referenca                                              |
|------------------------------------------------------|---------------|---------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b><u>Proizvodnja ROS</u></b>                        |               |                           |                                                        |
| <b>Fotosintetski TE (PSI ili PSII)</b>               | H             | $O_2^{\cdot-}$            | Asada <i>et al.</i> , 1987; Asada, 1999                |
| <b>Respiracioni TE</b>                               | M             | $O_2^{\cdot-}$            | Dat <i>et al.</i> , 2000; Maxwell <i>et al.</i> , 1999 |
| <b>Glikolat oksidaza</b>                             | P             | $H_2O_2$                  | Corpas <i>et al.</i> , 2001                            |
| <b>Ekscitirani hlorofil</b>                          | H             | $^1O_2$                   | Asada <i>et al.</i> , 1987                             |
| <b>NADPH oksidaza</b>                                | PM            | $O_2^{\cdot-}$            | Hammond-Kosack & Jones, 1996; Grant & Loake, 2000      |
| <b><math>\beta</math>-oksidacija masnih kiselina</b> | P             | $H_2O_2$                  | Corpas <i>et al.</i> , 2001                            |
| <b>Oksalat oksidaza</b>                              | A             | $H_2O_2$                  | Dat <i>et al.</i> , 2000                               |
| <b>Ksantin oksidaza</b>                              | P             | $O_2^{\cdot-}$            | Corpas <i>et al.</i> , 2001                            |
| <b>Peroksidaze, <math>Mn^{2+}</math> i NADH</b>      | ĆZ            | $H_2O_2$ , $O_2^{\cdot-}$ | Hammond-Kosack & Jones, 1996; Grant & Loake, 2000      |
| <b>Amin oksidaza</b>                                 | A             | $H_2O_2$                  | Allan & Fluhr, 1997                                    |
| <b><u>Uklanjanje ROS</u></b>                         |               |                           |                                                        |
| <b>SOD</b>                                           | H, C, M, P, A | $O_2^{\cdot-}$            | Bowler <i>et al.</i> , 1992                            |
| <b>APX</b>                                           | H, C, M, P, A | $H_2O_2$                  | Asada <i>et al.</i> , 1987; Asada, 1999                |
| <b>CAT</b>                                           | P             | $H_2O_2$                  | Willekens <i>et al.</i> , 1997                         |
| <b>Glutation peroksidaza</b>                         | C             | $H_2O_2$ , ROOH           | Dixon <i>et al.</i> , 1998                             |
| <b>POX</b>                                           | ĆZ, C, V      | $H_2O_2$                  | Asada <i>et al.</i> , 1987                             |
| <b>Tioredoksin peroksidaza</b>                       | H, C, M       | $H_2O_2$                  | Baier & Dietz, 1996                                    |
| <b>Askorbinska kiselina</b>                          | H, C, M, P, A | $H_2O_2$ , $O_2^{\cdot-}$ | Asada, 1999; Noctor & Foyer, 1998                      |
| <b>Glutation</b>                                     | H, C, M, P, A | $H_2O_2$                  | Asada, 1999; Noctor & Foyer, 1998                      |
| <b><math>\alpha</math>-Tokoferol</b>                 | Me            | ROOH, $^1O_2$             | Asada <i>et al.</i> , 1987                             |
| <b>Karotenoidi</b>                                   | H             | $^1O_2$                   | Asada <i>et al.</i> , 1987                             |

**PEROKSIDAZE (POX)** - se dele u tri grupe. Podela je izvršena na osnovu razlika u primarnoj strukturi proteina (Akiyoshi *et al.*, 2003):

1. unutarćelijski enzimi biljaka, bakterija i kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), kao što su bakterijske citohrom-c peroksidaze, katalaza-peroksidaze i askorbat peroksidaze
2. vanćelijske peroksidaze gljiva, kao što su lignin peroksidaze i  $Mn^{2+}$  nezavisne peroksidaze
3. enzimi (EC 1.11.1.7) koji su prvobitno opisani kao peroksidaze: oni se izlučuju iz ćelije ili se transportuju u vakuolu (Rahnama & Ebrahimzadeh, 2006). Ovi enzimi kao elektron donore najčešće koristi fenole (Welinder & Gajhede, 1993).

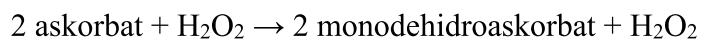
U reakciji oksidacije fenolnih jedinjenja važnu ulogu ima askorbat kao sekundarni elektron donor (Otter & Polle, 1994; Takahama *et al.*, 1999) koji redukuje novonastali fenoksil radikal i uključuje se u askorbat glutationski ciklus.

Peroksidaze imaju široku supstratnu specifičnost i vrše uklanjanje  $H_2O_2$  iz citoplazme i hloroplasta, odgovor na fizičke povrede, oksidaciju toksičnih jedinjenja, sintezu ćelijskog zida, odbranu od patogena, sintezu etilena (Milošević, 2010).



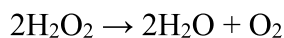
Askorbatne peroksidaze (APX, EC 1.11.1.11) zahtevaju prisustvo askorbata kao elektron donora i odgovorne su za eliminisanje  $H_2O_2$  iz tilakoida i citoplazme viših biljaka. Osim u citoplazmi i tilakoidima, APX izoenzimi su prisutni u stromi i membranama hloroplasta, glioksizoma i peroksizoma (Shigeru *et al.*, 2002). Mogu se naći kod viših biljaka, algi i cijanobakterija (Mittler & Zilinskas, 1993).

Katalizuju reakciju:





**KATALAZA (CAT, EC 1.11.1.6)** - je tetramerni enzim koji sadrži hem kao kofaktor i vrši uklanjanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iz ćelije.



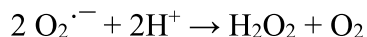
Ovog enzima najviše ima u peroksizomima (Scandalios *et al.*, 1997; Foyer & Noctor 2000), a može se naći i u glioksizomima i nekim drugim organelama (Tolbert, 1980; Dat *et al.*, 2000). CAT učestvuje u razgradnji vodonik peroksida koji nastaje tokom glioksalatnog ciklusa fotorespiracije, katabolizma purina i kao posledica aktivnosti oksidaza uključenih u β-oksidaciju masnih kiselina (Willekens *et al.*, 1997; Feierabend, 2005; Engel *et al.*, 2006).

Postoje tri izoforme katalaza, koje kodiraju različiti geni i koje se razlikuju po profilima ekspresije: CAT 1, CAT 2 i CAT 3 (Willekens *et al.*, 1995). Izolovani su geni za CAT 1 (Frugoli *et al.*, 1996), CAT 2 (Chevalier *et al.*, 1992) i CAT 3 (Newman *et al.*, 1994). Broj katalaznih izoformi je različit kod različitih biljaka. Broj izoformi se kreće od 2-12 katalaza koje pripadaju pomenutim tipovima; tako su kod *Ricinus communis* nađene dve izoforme (Ota *et al.*, 1992), tri kod duvana (Havir & McHale, 1987), pet kod spanaća (Galston *et al.*, 1951), pet kod kukuruza (Williamson & Scandalios, 1993), pet kod pamuka (Ni *et al.*, 1990), šest kod *A. thaliana* (Frugoli *et al.*, 1996) i čak 12 kod slačice (Drumm & Schopfer, 1974).

Do danas su opisane tri osnovne grupe katalaza koje su filogenetski udaljene :

1. monofunkcionalne katalaze su najrasprostranjenija i najbolje proučena grupa katalaza. To su tipične katalaze i najčešće su to tetramerni enzimi.
2. Bifunkcionalne katalaze - peroksidaze su filogenetski povezane sa askorbat peroksidazama i citohrom c oksidazama iz eukariota. Pretežno su dimerni molekuli.
3. Mn-katalaze koje ne sadrže hem. Njihov aktivni centar je bogat manganom.

**SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD, EC 1.15.1.1.)** - su metaloproteini koji katalizuju dismutaciju superoksid anjon radikala ( $O_2^{\cdot-}$ ) do molekularnog kiseonika i vodonik peroksida.



Proces dismutacije se zasniva na istovremenoj oksidaciji jednog radikala i redukciji drugog (Michalski, 1996). SOD uklanja superoksid, što direktno smanjuje rizik od formiranja hidroksil radikala tokom reakcije Haber-Weiss tipa (Aropa *et al.*, 2002). SOD je prisutna kod svih aerobnih organizama i smatra se da ima centralnu ulogu u zaštiti organizma od oksidativnog stresa (Scandalios, 1993., Bowler *et al.*, 1994., Alcher *et al.*, 2007).

Klasifikacija SOD je izvršena na osnovu metalnog kofaktora koji enzim koristi da bi bio aktivan. Postoje Fe-SOD, Mn-SOD, Ni-SOD i Cu/Zn-SOD.

Kod viših biljaka Cu/Zn-SOD i Fe-SOD su dimeri, dok je Mn-SOD tetramer (Bowler *et al.*, 1994., Alscher *et al.*, 2002). Mn-SOD se nalazi u mitohondrijama i peroksizomima (Corpas *et al.*, 1998; Hernandez *et al.*, 1999), ali se može javiti i u solubilnoj citosolnoj frakciji (Becana *et al.*, 1986; Hernandez *et al.*, 1994). Cu/Zn-SOD je karakteristična za citoplazmu i hloroplaste. Fe-SOD se nalazi u hloroplastima (Gomez *et al.*, 1999), ali je otkriven i u mitohondrijama (Salin, 1988; Droillard & Paulin, 1990). Ovaj enzim nije univerzalno prisutan kod svih viših biljaka. Fe-SOD predstavlja najstariju formu ovog enzima. Ni-SOD je homoheksamerni protein otkriven kod nekih prokariota. Svi tipovi SOD kod biljaka su proteini kodirani jedarnim genima i mogu se identifikovati na osnovu osetljivosti prema inhibitorima KCN i  $H_2O_2$ . Mn-SOD je otporan na oba inhibitora, Cu/Zn-SOD je osetljiv na navedene, dok je Fe-SOD osetljiv na  $H_2O_2$ , a otporan na KCN. Prisustvo SOD u skoro svim ćelijskim organelama je neophodno zbog nepropustljivosti fosfolipidnih membrana za superoksid (Takahachi & Asada, 1983).

Na osnovu poređenja sekvenci aminokiselina, smatra se da Mn-SOD i Fe-SOD imaju slično poreklo i da su u procesu evolucije nastale mnogo pre izoforme Cu/Zn-SOD, koja je evoluirala nezavisno kod eukariota (Kanematsu & Asada, 1990). Fe-SOD nije otkriven kod životinja, pa ovo navodi na pretpostavku da je gen koji kodira Fe-

SOD tokom evolucije nastao u plastidima, a zatim se tokom procesa evolucije premestio u genom nukleusa. U prilog ovoj teoriji ide činjenica da se u Fe-SOD sekvenci kod biljaka i cijanobakterija nalazi nekoliko konzervativnih regiona koji ne postoje kod nefotosintetičkih bakterija (Bowler *et al.*, 1994).

U mnogim istraživanjima koja su ispitivala aktivnost SOD pokazano je da ovaj enzim ima pojačanu aktivnost u različitim tipovima stresa.

### **1.8.3. Antioksidativni sistemi i mehanizmi zaštite od stresa kod briofita**

Kod briofita koje rastu na zaslanjenim podlogama, uočava se sinteza i akumulacija različitih supstanci poput osmolita i osmoprotektanata u citoplazmi. Ova pojava se naziva osmotsko prilagođavanje. Ta jedinjenja su najčešće aminokiseline (prolin, alanin, glicin), šećeri (saharoza, trehaloza, maltoza) i šećerni alkoholi (manitol, sorbitol) (Erxleben *et al.*, 2012).

U zavisnosti od vrste, javljaju se specifičniji osmoliti, posebno šećeri. Njihova uloga je da snižavaju osmotski potencijal na nivo niži od potencijala okolne sredine, kako bi usvajanje vode bilo što efikasnije. Ispitivanjem sadržaja šećera u biljkama tokom stresnih uslova, pokazano je da se u značajnim koncentracijama akumuliraju glukoza, saharoza i fruktoza. Oni predstavljaju uobičajene šećere koji se sintetišu i akumuliraju, kako u vaskularnim biljkama, tako i u briofitama (Sivakumar *et al.*, 2002; Couée, 2006; Yin *et al.*, 2010; Klavina, 2014). Ipak, u zavisnosti od genotipa, vrste i uslova stresa, briofite mogu da akumuliraju i neke specifične šećere (Robinson *et al.*, 2000; Marschall & Laufer, 2002; Pejin *et al.*, 2012a; Klavina, 2014).

Takođe, neki osmoprotektanti, zbog svoje hidrofilne prirode, imaju funkciju zadržavanja minimalnog sadržaja vode u ćeliji koja je u stanju desikacije. Posebno se indukuje sinteza LEA proteina grupe II, kao što su dehidrini, koji su zaslužni za toleranciju na osmotski stres i vodni deficit (Ruibal *et al.*, 2012). LEA proteini generalno održavaju enzimsku aktivnost i deluju kao skevendžeri (hvatači) slobodnih radikala i stabilizuju membrane (Wang *et al.*, 2008a). Takođe, ovi proteini nisu zaslužni samo za preživljavanje biljke u nepovoljnim uslovima, već i u njenom oporakvu i obnavljanju metaboličkih procesa nakon prestanka delovanja stresogenih faktora. COR

(„Cold-regulated“) proteini su važni u toleranciji pri smrzavanju. Zanimljivo je da se COR proteini aktiviraju pri izloženosti biljaka stresu solima, osmotskom stresu i tretmanu sa ABA (Frank *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008a).

U odbrani ćelija i zaštiti njenih makromolekula učestvuju najčešće proteini iz familije „heat shock“ (HSPs). Kod mahovina se specifično javljaju mali Hsps (sHSP), proteini iz ubikvitinske familije, koji deluju kao molekularni šaperoni, sprečavajući agregaciju denaturisanih proteina ili potpomažući drugim šaperonima da uspostave pravilnu konformaciju proteina u stanju stresa (Wang *et al.*, 2008a).

Fenolna jedinjenja poseduju značajna fiziološko-hemijska svojstva i biološke karakteristike. Posebno je izražena sinteza fenola kod biljaka koje rastu na podlozi sa slabim do umerenim salinitetom, dok se na visokim koncentracijama soli može primetiti znatni pad sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u biljkama (Navarro *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2012; Rezazadeh *et al.*, 2012). Takođe, poznato je da briofite sintetišu veliki broj sekundarnih metabolita, između ostalog i fenolna jedinjenja, u odgovoru na različite sredinske stresore (Asakawa, 2007).

#### 1.8.4. Uloga apscisinske kiseline u odgovoru briofita na abiotički stres

Apscisinska kiselina (ABA) je nazvana **hormon stresa**, jer ima veoma važnu ulogu kao signalni molekul u stresnim uslovima, kada je biljka izložena dejstvu ekstremnih spoljašnjih faktora. Dominantno mesto sinteze ABA su ćelije koje sadrže plastide, etioplaste, hloroplaste ili amiloplaste.

Biosinteza apscisinske kiseline obavlja se u hloroplastima i drugim plastidima. Početno jedinjenje u sintezi je izopentenil pirofosfat, koji nastaje od piruvata i gliceraldehid-3-fosfata. Dalje su moguća dva alternativna puta biosinteze ovog hormona: direktan od farnezil pirofosfata i indirektan od karotenoida. Apscisinska kiselina je podložna promenama koje je inaktiviraju. Jedan način njene inaktivacije jeste oksidacija, kojom se preko hidroksi-metil-ABA dobija fazeinska, a potom i dihidrofazeinska kiselina. Ova jedinjenja imaju mnogo slabija fiziološka dejstva nego ABA. Drugi način njene inaktivacije jeste njena konjugacija sa šećerima. Apscisinska

kiselina i jedinjenja koja su proizvodi njenog metabolizma imaju regulatornu ulogu u onim fazama razvika u kojima biljka prelazi iz aktivnog rastenja u stanje mirovanja.

ABA ima niz značajnih uloga i kod traheofita i kod briofita. Kod traheofita važna je u regulaciji transpiracije, stresnim odgovorima, klijanju semena i embriogenezi. Njena najvažnija funkcija je u signalizaciji vodnog stresa i regulaciji gubitka vode. Utvrđeno je njeno prisustvo u protonemi kod *Funaria hygrometrica* (Bhatla & Dhingra-Babbar, 1990; Werner *et al.*, 1991). Iako putevi biosinteze ABA nisu u potpunosti poznati kod ove grupe biljaka, utvrđeno je da briofite sintetišu apscisinsku kiselinu.

Najveća koncentracija ovog hormona nalazi se kod briofita koje su adaptirane na sušne uslove sredine, a najniža koncentracija je kod akvatičnih vrsta, što ukazuje da ABA može imati ulogu u toleranciji na sušu i stressolima (Hartung *et al.*, 1994). U slučaju vrste *F. hygrometrica* ABA čini protonemu otpornom na sušu a kod biljaka iz reda Marchantiales ona indukuje toleranciju talusa na sušu. Pokazano je da postepeno isušivanje mahovine *F. hygrometrica* dovodi do porasta sadržaja ABA čak do 10 nmol/g suve težine (Werner *et al.*, 1991). Iako su starija istraživanja pokazivala da jetrenjače ne sintetišu ABA (Chopra & Kumar, 1988), rezultati novijih istraživanja na pojedinim jetrenjačama ukazuju na činjenicu da ove biljke npr. *Riccia* sp. sadrže značajne količine ABA (Bopp & Werner, 1993). Takođe je pokazano da i rožnjače u svom suvom stanju sadrže značajne količine ovog hormona.

U slučaju krioprezervacije, upotreba ABA skraćuje dužinu postupka kao i gubitak biljnog materijala u slučaju vrsta *Ceratodon purpureus*, *P. patens*, *F. hygrometrica* (Christianson, 1998). Takođe, Dence (1998) je otkrio da je ABA neophodna za krioprezervaciju nekih jetrenjača kao što su *R. fluitans* i *M. polymorpha*, jer sprečava oštećenja koja bi nastala desikacijom.

Kod *Atrichum androgynum* primena ABA pre desikacije smanjuje curenje elektrolita kroz membranu (Becet, 1999). Takođe je poznato da ABA povećava toleranciju na isušivanje mahovine *A. undulatum*. Becet (1999) je pretpostavio da predtretman ABA-om, može smanjiti prenos energije između hlorofila koji apsorbuje svetlost i fotosistema II. Predtretman ABA-om bi mogao povećati toleranciju mahovinana stres isušivanja, smanjujući produkciju ROS formi u fotosistemu II.

Eksperimentalno je pokazano da se fotosistem II znatno brže oporavlja nakon desikacije, ako su biljke imale predtretman ABA-om.

ABA može imati i još jednu važnu ulogu. Jedna od najozbiljnijih posledica isušivanja jeste narušavanje integriteta ćelijske membrane, što dovodi do njene izmenjene propustljivosti. Becet (1999) je otkrio da bi primena ABA mogla da smanji gubitak kalijuma kod *A. androgynum*, na sličan način kao što bi bila i delimična dehidratacija, koja prethodi isušivanju. Dobijeni rezultati su pokazali smanjenje relativnog sadržaja vode u ćeliji, koji je smanjio gubitak kalijuma za 15-20%.

Najnovija istraživanja pokazala su da ABA poboljšava toleranciju na stres suše i osmotski stres kod briofita (Cuming, 2011; Khandelwal *et al.*, 2010).

## **1.9. Biologija ispitivanih vrsta**

### **1.9.1. *Physcomitrella patens*(Hedw.) Bruch & Schimp.**

Vrsta *P. patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. (Slika 16) pripada klasi Bryopsida, redu Funariales, familiji Funariaceae i rodu *Physcomitrella*. *P. patens* je širokog rasprostranjenja u umerenom klimatu, i efemernog je pojavljivanja na vlažnim podlogama. Često se može naći u delovima gde voda plavi, kao i uz samu obalu vodenih ekosistema (Hodgetts, 2010; Cuming, 2011), zbog čega i ima kratak životni ciklus.

Životni ciklus *P. patens* se odvija kroz naizmeničnu smenu dve faze, slobodno živećeg haploidnog gametofita i diploidnog sporofita, koji je delimično zavisao od gametofita u pogledu ishrane i potpore (Cove *et al.*, 1997). Gametofitna generacija otpočinje klijanjem haploidne spore iz koje se apikalnim rastom formira germinaciona cev. Ona izrasta i formira razgranatu filamentoznu protonemu. Protonema se sastoji od dva različita tipa ćelija: ćelije hloroneme i kauloneme. Za razliku od biljaka sa semenom, haploidni gametofit predstavlja dominantnu fazu kod mahovina.

U kulturi *in vitro*, u procesu regeneracije protoplasta, zapaženo je da se direktno razvijaju hloronemalni filament, a tek kasnije kaulonema (Cove *et al.*, 1997). Na protonemi se formiraju pupoljci, od čije će apikalne ćelije nastati inicijalni meristem za razviće listastog adultnog gametofita. Na ovaj način se postiže prelaz iz juvenilnog

protonemalnog tkiva ka adultnom gametofitu, koji se odlikuje stabljikom sa listićima i rizoidima na bazi.

Sledeća faza u razviću briofita je formiranje seksualnih organa. Obzirom da se oni razvijaju na adultnom gametofitu, on se može nazvati i gametoforom (Frank *et al.*, 2005). Hermafroditne vrste mahovina, kojima pripada i *P.patens*, nose i muške (anteridije) i ženske (arhegonije) polne organe na istoj biljci.

Genom *P. patens* je kompletno sekvenciran i objavljen početkom 2008. godine (Rensing *et al.*, 2008). Primenom protočne citometrije i mikroskopije, procenjeno je da se haploidni genom sastoji od 27 hromozoma, ukupne veličine od oko 510 Mbp (Lang *et al.*, 2008), što je tri puta više u poređenju sa genomom biljke *A. thaliana* (Cove *et al.*, 1997). Postoji oko 27000 gena, koji kodiraju proteine. Ipak, detaljnije analize su potrebne da bi se znao konačan broj gena, jer u genomu *P. patens* postoji dosta transpozona, transportnih i mikro RNK molekula (Lang *et al.*, 2008). Ovi podaci su od velikog značaja za komparativne analize sa genomima drugih biljaka, kao što su *A. thaliana* ili pirinač, što bi doprinelo razumevanju diverziteta biljaka.

*P. patens* predstavlja model sistem među briofitama. Bitna karakteristika ove vrste je da ima visok stepen homologne rekombinacije (Schaefer & Zrýd, 1997; Schaefer, 2002). Ono što čini *P. patens* pogodnom u istraživanjima jeste i kratak životni ciklus (Reski, 1998b; 1999; Cove, 2000). Takođe, jednostavna građa pogoduje praćenju intracelularnih procesa tokom morfogeneze.



**Slika 16.***Physcomitrella patens*

[http://www.korseby.net/outer/flora/bryophyta/funariaceae/physcomitrella\\_patens.jpeg](http://www.korseby.net/outer/flora/bryophyta/funariaceae/physcomitrella_patens.jpeg)



### 1.9.2. *Entosthodon hungaricus* (Boros) Loeske

*E. hungaricus* (Slika 17) je endemska evropska vrsta. Vrsta pripada klasi Bryopsida, redu Funariales, porodici Funariaceae. Ova mahovina je karakteristična za suva i slana staništa. Smatra se retkom i ugroženom vrstom. U ekološkom smislu, indikator je povećane zaslanjenosti staništa. Ekofiziološke i biohemijske karakteristike ove vrste su ono što joj na ovakvim staništima daje prednost i čini atraktivnom za istraživanja u oblasti fiziologije stresa, posebno mehanizama otpornosti i tolerancije na stres solima.



Slika 17. *Entosthodon hungaricus* (autor fotografije Nada Nikolić)

### 1.9.3. *Henediella heimii* (Hedw.) Hampe

Vrsta *H. heimii* (Slika 18) pripada klasi Bryopsida, redu Pottiales, porodici Pottiaceae i rodu *Henediella*. Sinonimi za ovu vrstu su *Desmatodon heimii* (Hedw.) Mitten i *Pottia heimii* (Hedw.) Führrrohr. *H. heimii* naseljava pretežno obale slanih ili brakičnih vodenih površina, kao što su slane močvare i blatnjave depresije, zaslanjena zemljišta u unutrašnjosti kopna i ivice prometnih puteva sa kojih se spiraju soli. *H. heimii* je retka i ugrožena vrsta mahovina koja je karakteristična za slana staništa, a o čijoj biologiji se malo zna. U ekološkom smislu, indikator je povećane zaslanjenosti staništa. Misli se da je obligatan halofit. Ipak, njeno prisustvo na ovakvim staništima može biti odraz slabe kompetitivnosti, a prejake konkurencije drugih biljaka van slanih staništa. Ekofiziološke i biohemijske karakteristike ove vrste su ono što joj na ovakvim



staništima daje prednost i čini atraktivnom za istraživanja u oblasti fiziologije stresa, posebno mehanizama otpornosti i tolerancije na stres solima.

*H. heimii* raste u busenovima dužine oko 2.5 cm, koji su žućkasto-zelene ili braon boje i koji podsećaju na mnoge druge mahovine (Slika 18). Sporofit ove vrste je veoma specifičan i ne može se pomešati ni sa jednom drugom vrstom mahovina. Sporofit poseduje dugu, debelu i izuvijanu setu, koja može biti duža od 1 cm. Kapsula ima dug i koso postavljen poklopac. Kada je zrela izdiže se iznad otvora uz pomoć krutog stubića izgrađenog od unutrašnjeg tkiva kapsule (kolumele) i na taj način dobija karakterističan izgled koji podseća na čarobnjakov šešir (Slika 18).

Spore se oslobađaju tako što poklopac, koji je inače veoma istrajan, otpadne sa čaure. Što se tiče gametofita, on podseća na veliki broj uobičajenih, efemernih mahovina, kao što je *Tortula truncata*, ali za razliku od nje, *H. heimii* ima nazubljeni vrh filoida i formira svetlo zelene grupacije sa čvrstim rozetama širih filoida. Oblik filoida se kreće od ovalnog do nazubljenog i imaju izraženo srednje rebro. Dugi su oko 1.5-2 cm i postaju duži i više paralelno postavljeni u odnosu na vrh kratkog kauloida.



**Slika 18.** *H. heimii* u prirodnom staništu

Izvor: <http://moonmoths.blogspot.rs/2011/04/wernffrwd-salt-marsh-mound.html>



*CILJEVI*



## 2. CILJEVI RADA

Osnovni ciljevi istraživanja izvedenih u okviru ovog rada bili su:

1. Ispitivanje uticaja egzogeno dodate abscisinske kiseline na morfogenezu odabranih vrsta briofita

2. Uspostavljanje *in vitro* sistema za propagaciju retkih i/ili ugroženih vrsta mahovina *E. hungaricus* i *H. heimii*.

3. Određivanje optimalnih koncentracija auksina i citokinina u procesu morfogeneze *E. hungaricus* i *H. heimii*.

4. Ispitivanje i poređenje mehanizama koji su odgovorni za preživljavanje i/ili toleranciju *E. hungaricus*, *H. heimii* i *P. patens* na stres solima tokom tri dana tri nedelje gajenja na hranljivim podlogama sa različitim koncentracijama NaCl u uslovima *in vitro*

5. Uporedno ispitivanje biohemijskih i ekofizioloških parametara kod navedene tri vrste mahovina u uslovima stresa solima.



# *MATERIJAL I METODE*



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Biljni material

Kao polazni biljni materijal korišćene su tri vrste mahovina (*E. hungaricus*, *H. heimii* i *P. patens*). Biljni materijal za uspostavljanje *in vitro* kultura *E. hungaricus* i *H. heimii* sakupljen je na zaslanjenim zemljištima na teritoriji Mađarske, a vrsta *P. patens* predstavlja umnoženi genotip „Gransden“ ove sekvencirane model mahovine. Biljni materijal vrste *P. patens* dobijen je iz laboratorije u Frajburgu. U eksperimentima su korišćeni samo umnoženi genetski nepromenjeni divlji tipovi sve tri vrste.

Prva faza uspostavljanja *in vitro* kultura mahovina *E. hungaricus* i *H. heimii* jeste sterilizacija biljnog materijala donetog iz prirode. Sterilizacija je vršena odvajanjem delova sporofita i gametofita i njihovim potapanjem u različite rastvore koji služe kao dezinfekciono sredstvo. Rastvori korišćeni za sterilizaciju su: sterilna voda, hipohlorasta kiselina (NaOCl), etanol i natrijum dodecilorid (NaDCC). Sterilisani su i gametofit i sporofit, različitim sterilizacionim sredstvima i u različitom vremenskom periodu izlaganja biljnog materijala navedenim rastvorima za sterilizaciju. Nakon sterilizacije, biljni materijal je ispiran sterilnom dejonizovanom vodom i prebacivan na hranljivi medijum.

Nakon uspostavljanja kulture *in vitro*, u hranljivi medijum (BCD) su egzogeno dodate različite koncentracije regulatora rastanja i razvića biljaka, tj. auksini (indol-3-buterna kiselina – IBA) i citokinini (6-benzilaminopurin – BAP). Praćen je pojedinačni efekat auksina, odnosno citokinina, kao i njihov sinergistički efekat na morfogenezu ispitivanih vrsta mahovina. Koncentracije regulatora rastanja i razvića korišćene u postavci eksperimenta su: 0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10  $\mu$ M. Nakon isteka šest nedelja mereni su najvažniji parametri morfogeneze: prečnik protoneme i indeks multiplikacije.

#### Dizajn eksperimenta:

U eksperimentima u kojima je praćen efekat stresa solima na morfogenezu i preživljavanje tri ispitivane vrste mahovina, korišćene su različite koncentracije NaCl (0,

5, 10, 50, 100, 200, 300 i 500 mM). U svim eksperimentima, za sve tretmane, postavljano je po 15 eksplantata dužine 1 cm u po četiri Petri kutije po navedenoj koncentraciji soli.

**I eksperiment:** Dugotrajni stres solima je trajao tri nedelje. Biljke su u uslovima *in vitro* postavljane na različite koncentracije NaCl. Ovaj tip eksperimenta predstavlja dugotrajno izlaganje biljaka stresu solima.

**II eksperiment:** Ovaj tip eksperimenta je trajao tri dana. Biljke su postavljane na različite koncentracije NaCl i gajene su u uslovima *in vitro*. Ovaj tip eksperimenta predstavlja kratkotrajno izlaganje biljaka stresu solima.

Po završetku eksperimenta mereni su sledeći parametri morfogeneze:

1. Prisustvo i prečnik protoneme;
2. Indeks multiplikacije;
3. Preživljavanje.

Indeksom multiplikacije se smatra broj adventivnih izdanaka mahovina *H. heimii*, *E. hungaricus* i *P. patens* koji su se razvili multiplikacijom početnog eksplantata. Nakon morfometrijskih merenja biljni materijal je stavljen u ependorfe koje su potapane u tečni azot, potom čuvane u zamrzivaču na -70 °C i materijal je korišćen za dalje analize.

Osim merenja navedenih morfogenetskih parametara, rađeno je spektrofotometrijsko određivanje koncentracije fotosintetičkih pigmenata, ukupnih proteina, prolina, slobodnih aminokiselina, fenolnih jedinjenja i kvantifikacija aktivnosti anioksidativnih enzima (peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaze). Za razdvajanje izoformi rastvorljivih ćelijskih enzima korišćena je nadenaturišuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu, a šećeri i fenoli su analizirani HPLC metodom.

### **3.2. Sterilizacija posuđa, instrumenata i hranljivih podloga**

Sve hranljive podloge i stakleno posuđe za gajenje kultura sterilisani su u autoklavu 25 – 30 min na temperaturi od 114 °C i pri pritisku od 0.67 bara (0.067 MPa ili 0.8 atm), dok su staklene Petri kutije i voda sterilisani u autoklavu 60 min, na temperaturi od 135 °C. Instrumenti koji su korišćeni za manipulaciju biljkama, sterilisni su neposredno pre rada u laminaru, prokuvavanjem 30 min u destilovanoj vodi. Zatim su

prenošeni u posudu sa 96% etanolom, a potom sterilisani nad plamenikom špiritusne lampe u laminarnoj komori.

Sve aseptične manipulacije sa biljnim kulturama obavljene su u laminarnoj komori. Radna ploča laminara pre početka rada očišćena je 96% etanolom. Manipulacija kulturama je obavljana na sterilnim kartonskim tacnama ili Petri kutijama.

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

Sve kulture su gajene u specijalizovanim prostorijama sterilnog bloka Biološkog fakulteta, na Institutu za botaniku i Botaničkoj bašti „Jevremovac“, pri kontrolisanim uslovima sredine: temperatura je održavana na  $18 \pm 2$  °C, a vlažnost vazduha na 60-70%, pri uslovima dugog dana (16h svetlo, 8h mrak). Kao izvor svetlosti korišćene su fluorescentne cevi “Tesla” Pančevo, 65 W, fluksa  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

### 3.4. Sastav hranljivih podloga

Za sve tri vrste mahovina korišćena je trokomponentna BCD podloga (Ashton & Cove 1977; Tabele 2 – 5) sledećeg sastava: komponente B, C i D, koje sadrže različite mineralne soli u različitim količinama, kao i soli u tragovima.

**Tabela 2.** Sastav B komponente u osnovnoj BCD podlozi

| B komponenta                                     | količina (g/l) |
|--------------------------------------------------|----------------|
| MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O             | 25 g           |
| Anhidrovani MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O | 12 g           |

**Tabela 3.** Sastav C komponente u osnovnoj BCD podlozi

| C komponenta                        | količina (g/l) |
|-------------------------------------|----------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | 25 g           |
| Voda                                | 500 ml         |
| pH podesiti na 6.5<br>pomoću 4M KOH | do 1l vode     |

**Tabela 4.** Sastav D komponente u osnovnoj BCD podlozi

| D komponenta                         | količina (g/l) |
|--------------------------------------|----------------|
| KNO <sub>3</sub>                     | 101 g          |
| FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O | 1.25 g         |

**Tabela 5.** Sastav elemenata u tragovima u osnovnoj BCD podlozi

| Elementi u tragovima                                   | količina (g/l) |
|--------------------------------------------------------|----------------|
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                         | 614 mg         |
| AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> x12H <sub>2</sub> O | 110 mg         |
| CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O                   | 55 mg          |
| KBr                                                    | 28 mg          |
| LiCl                                                   | 28 mg          |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O    | 25 mg          |
| MnCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O                   | 389 mg         |
| CoCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O                   | 55 mg          |
| ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O                   | 55 mg          |
| KI                                                     | 28 mg          |
| SnCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O                   | 28 mg          |
| NiCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O                   | 59 mg          |

U podloge je dodavano 8 g/l agara, a pH vrednost medijuma je podešavana na 5.8-6.0 jedinica.



### 3.5. Spektrofotometrijska analiza fotosintetičkih pigmenata

Za izolaciju hlorofila i karotenoida korišćeno je po 20 mg zamrznutog biljnog materijala za svaki tretmani 2 ml 96% etanola. Ependorfe su stavljene u termo šejker i inkubacija je trajala 10 min na 70 °C. Etanol sa ekstrahovanim pigmentima prebačen je u kvarcnu kivetu i kvantifikacija sadržaja hlorofila i karotenoida vršena je na spektrofotometru (UV – visible Spektrofotometar, Agilent 8453), na tri talasne duzine: 470, 648 i 664 nm.

Koncentracije fotosintetičkih pigmenata računane su prema sledećim formulama (Lichtenthaler, 1987), u odnosu na suhu masu uzoraka:

$$C_{(a+b)} = 5.24 A_{664} + 22.24 A_{648} \text{ ukupna količina hlorofila}$$

$$C_a = 13.36 A_{664} - 5.19 A_{648}$$

$$C_b = 27.43 A_{648} - 8.12 A_{664}$$

$$C_{(x+c)} = 1000 A_{470} - 2,13 C_a - 97.64 C_b / 209 \text{ ukupna količina karotenoida}$$

Odnos hlorofila a i b je računat po formuli  $C_a/C_b$ .

### 3.6. Izolacija i kvantifikacija fotosintetičkih pigmenata i tokoferola

Za određivanje izabranih metabolita su korišćeni standardi  $\alpha$  -,  $\beta$  -,  $\gamma$  -,  $\delta$  - tokoferol, hlorogena kiselina i rutin (proizvođač Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemačka);  $\alpha$  -,  $\beta$  - karoten, neoksantin, violaksantin, anteraksantin, zeaksatin, lutein i hlorofil korišćeni su iz DHI LAB proizvoda (Hoersholm, Danska). Svi standardi su bili visoko prečišćeni (najmanje 95% čistoće). Rastvarači aceton, etilacetat, metanol i acetonitril (proizvođač Merck) su bili analitičke (HPLC) čistoće. Voda koja se koristila za pripremu rastvora bila je bidestilovana i prečišćena sa Milli-Q vodenim sistemom tipa Millipore (Braedford, SAD).

Hloroplastni pigmenti (neoksantin, violaksantin, anteraksantin, zeaksatin, lutein,  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, hlorofil a, hlorofil b) su određeni metodom opisanom u radu Morales i Himenez (2003). Pigmenti su ekstrahovani iz 100mg liofilizovanog homogenizovanog biljnog materijala sa 5 ml ledeno hladnog acetona u ledenom

kupatilu, koristeći T-25 Ultra-Turrax-ov (IKA-LABORTECHNIK, Staufen, Nemačka) homogenizator na 25 s. Sve procedure ekstrakcije urađene su pri slabom svetlu.

Dobijeni ekstrakti su filtrirani kroz 0.2 µm Minisart SRP 15 filtere (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Nemačka) i zatim podvrgnuti HPLC analizi (Spherisorb S5 ODS-2 250 x 4.6 mm kolona sa S5 ODS-2 50 x 4.6 mm predkolonom (Alltech Associates, Inc., Deerfield, USA)), korišćenjem sledećih rastvarača: rastvarač A: acetonitril/metanol/voda (100/10/5, v/v/v); rastvarač B: aceton/etilacetat (2/1, v/v), pri brzini protoka od 1 ml min<sup>-1</sup>, korišćenjem linearnog gradijenta od 10% rastvarača B do 70% rastvarača B 18 min, sa vremenom od 30 min i fotometrijskom detekcijom na 440 nm. HPLC analiza je izvedena na Spectra-Physics HPLC sistemu sa Spectra Focus UV-vis detektorom (Fremont, USA). Identifikacija jedinjenja je dobijena poređenjem retencionih vremena i spektara kao i dodavanjem standarda. Koncentracije pigmenata su izračunate uz pomoć odgovarajućih spoljašnjih standarda.

### **3.7. Izolacija ukupnih solubilnih proteina**

Za izolaciju ukupnih solubilnih proteina korišćen je po 1 g zamrznutog biljnog materiala, iz kulture *in vitro*. Uzorci su homogenizovani u avanu pomoću tečnog azota, uz dodavanje 1 ml ekstrakcionog pufera (Tabela 6). Pufer sadrži: polivinilpolipirolidon – PVPP, koji vezuje fenole (oni oksiduju proteine i deaktiviraju ih), ditiotritol – DTT koji sprečava oksidaciju sulfhidrilnih grupa i stvaranje disulfidnih mostova, a samim tim, promenu konformacije proteina, zatim, glicerol, koji stabilizuje enzime, helirajući agens etilendiamintetrasirćetnu kiselinu – EDTA, koji ima ulogu da vezuje dvovalentne jone metala, neophodne za aktivnost enzima i fenilmetilsulfonil fluorad – PMSF koji je inhibitor proteaza.

**Tabela 6.** Pufer za ekstrakciju proteina (Simonović *et al.*, 2004)

| Supstanca                            | Količina za 100 ml                                   |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 10 x PEB (500mM Tris pH8, 10mM EDTA) | 10 ml (finalno 50 mM Tris, 1mM EDTA)                 |
| 87% glicerol                         | 17.25 ml (finalno 15%)                               |
| PVPP                                 | 1.5 g (finalno 1,5%)                                 |
| 1M DTT (100x)                        | 100 µM/10 ml ekstrakcionog pufera<br>(finalno 10 mM) |
| 100 mM PMSF u etanolu (100x)         | 100 µM/10 ml uzorka (finalno 1mM)                    |
| H <sub>2</sub> O                     | dopuniti do 100 ml                                   |

Homogenizovani uzorci sa ekstrakcionim puferom premešteni su u ependorfe, nakon čega su centrifugirani 5 min na 4 °C, pri brzini 12000 obrtaja (Eppendorf Mini Spin F-45-12-11 19528). Gornja faza tj. izdvojeni supernatant (u kome su se nalazili rastvorljivi proteini – “crude extract”) prebačen je u nove ependorfe na ledu, a potom je čuvan na -80 °C do upotrebe. U talogu su bili ćelijski ostaci – organele i ćelijski zid. Koncentracija ukupnih proteina određena je Bradfordovom metodom (Bradford, 1976). Metoda se zasniva na vezivanju boje komazi plavo G-250 za molekul proteina, odnosno, za aminokiselinske ostatke hidrofobnih aminokiselina i arginina. Korišćen je 1 ml Bradfordovog reagensa (Tabela 7) i 20 µl uzorka. Bradford reagens je tamno-crven, nakon dodavanja ekstrakta proteina, u zavisnosti od koncentracije istih, dobijene su različite nijanse plave boje, što je uslovalo različite vrednosti apsorbance izmerene pomoću spektrofotometra. Spektrofotometrijsko merenje je vršeno na talasnoj dužini od 595 nm, a kontrola je bila voda. Na osnovu standardne krive napravljene uz korišćenje šest standarada BSA rastvora (bovin serum albumina, Tabela 7) izračunata je koncentracija ukupnih proteina.

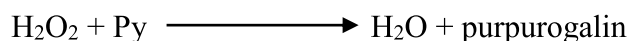
**Tabela 7.** Reagensi (Bradford, 1976)

|                                                                                      | Supstanca                                                                                                        | Količina  | Finalna koncentracija |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------|
| <b>Bradford-ov reagens (5x),</b><br>(Rastvor bi trebalo da bude tamnocrven, pH 0.01) | Komazi plavo G-250                                                                                               | 100 mg    | 0.5 mg/ml             |
|                                                                                      | Methanol ili etanol                                                                                              | 50 ml     | 25%                   |
|                                                                                      | 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                                                                               | 100 ml    | 42.5%                 |
|                                                                                      | Voda                                                                                                             | do 200 ml |                       |
| <b>Esej reagens</b>                                                                  | Bradford-ov rastvor                                                                                              | 100 ml    |                       |
|                                                                                      | Voda                                                                                                             | 400 ml    |                       |
| <b>Standardni rastvor BSA</b>                                                        | Pripremiti početni rastvor BSA sa vodom 10 mg/ml, zatim razblažiti u 6 standarda: 0; 0.25; 0.5; 1; 1.5 i 2mg/ml. |           |                       |
| <b>Uzorci</b>                                                                        | Ekstrakti proteina                                                                                               |           |                       |

### 3.8. Biohemijska analiza aktivnosti antioksidativnih enzima kod tretiranih biljaka

#### 3.8.1. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti solubilnih peroksidaza

Aktivnost ukupnih peroksidaza iz frakcije solubilnih ćelijskih proteina je praćena spektrofotometrijski, merenjem promene apsorbance na 430 nm. Aktivnost je merena 3 min, na svakih 20 sekundi. Korišćen je 0.05 M kalijum-fosfatni pufer (pH=6.5) i 1 M pirogalol kao supstrat za enzim, uz dodatak 1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posle prvih 20 sekundi od početka reakcije.



Peroksidaza je bisupstratni enzim koji katalizuje transfer elektrona sa donora pirogalola na vodonik peroksid (redukuje se), a pirogalol koji se oksiduje ( $\epsilon^{430} = 2.47 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) i daje žućkasto smeđe jedinjenje purpurogalin koji ima maksimum apsorpcije na 430 nm. Aktivnost peroksidaze od 1U ima ona količina enzima koja nagradi 1  $\mu\text{mol}$  produkta za jedan min. Aktivnost se određuje u toku linearnog dela krive, a izračunava se prema formuli:

$$Akt = (\Delta A * V_k) / (V_e * 2.47) \text{ [U/ml]}$$

$\Delta A$  - promena apsorbance u min,

$V_k$  - zapremina reakcione smeše u kiveti (ml),

$V_e$  - zapremina uzorka u kiveti (ml),

2.47 - molarni ekstinkcioni koeficijent pirogalola.

Aktivnost se izražava u odnosu na početnu suhu masu uzorka (U/g DW) ili u odnosu na koncentraciju ukupnih proteina (U/mg). Uslovi reakcije su  $T=28^{\circ}\text{C}$  i debljina kivete od 1 cm.

Sastav reakcione smese za kivetu od 1ml je:

890  $\mu\text{l}$  100mM natrijum-fosfatnog pufera (pH= 6.5)

30  $\mu\text{l}$  uzorka

60  $\mu\text{l}$  1M pirogalol (koncentracija u kiveti je 60 mM)

20  $\mu\text{l}$  1M  $\text{H}_2\text{O}_2$  (koncentracija u kiveti je 20 mM)

Reakcija započinje dodavanjem vodonik peroksida nakon 20 sekundi.

### **3.8.2. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti solubilnih katalaza**

Za određivanje aktivnosti katalaza korišćena je spektrofotometrijska metoda u kojoj smo pratili kinetiku nestajanja vodonik peroksida, na talasnoj dužini od 240 nm, merenjem promene apsorbance,  $\Delta A$  (smanjenjem) u vremenu  $\Delta t$  u toku linearnog dela krive.

Potrebni reagensi:

Reagens 1: 50 mM K-Na-fosfatni pufer (pH= 7.0)

Reagens 2: rastvor 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (priprema se sveže pre merenja i ostavlja se na temperaturi od  $4^{\circ}\text{C}$ )

Izmeri se apsorbanca smeše (2 ml reagensa 1 i 1 ml reagens 2) na 240 nm u odnosu na fosfatni pufer (reagens 1). Apsorbanca treba da iznosi 0.85 ( $\pm 0.02$ ). Ako nije zadovoljavajuća dodajemo više 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ili fosfatnog pufera u reagens 2 i ponovimo istu proveru. Dobijeni rastvor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> označimo kao reagens 3. Blank rastvor (kontrola) se pripremi dodavanjem 2 ml reagens 1 i 1 ml reagens 3 (bez uzorka) i meri se  $\Delta A_0$ .

Enzimski aktivnost se računa na osnovu sledeće formule:

$$Akt = (\Delta A - \Delta A_0) \cdot V_k / (0.0436 \cdot V_e) \text{ [U/ml]}$$

$\Delta A$  - promena apsorbanice u minutu,

$\Delta A_0$  - promena apsorbanice blank rastvora u minutu,

$V_k$  - zapremina reakcione smeše u kiveti (ml),

$V_e$  - zapremina uzorka u kiveti,

0.0436 predstavlja vrednost koja se odnosi na molarni ekstinkcioni koeficijent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na 240 nm [ $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ] (Aebi, 1984).

**Postupak:** u kivetu je sipano 1ml reagens 3, a zatim dodata ona zapremina reagens 1 tako da ukupna zapremina reakcione smeše u kiveti pre merenja bude 3ml (uključujući i zapreminu korišćenog uzorka, koja je uslovljena koncentracijom proteina). Dodaje se 20  $\mu\text{l}$  uzorka i lagano se izmućka sadržaj kivete. Katalazna reakcija praćena je u toku 3 min na 240 nm, na temperaturi od 25 °C.

### 3.8.3. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti superoksid dismutaza

Aktivnost ukupnih superoksid dismutaza je merena po metodi Beyer–a i Fridovich–a (1987). Reakciona smeša (1 ml) se sastojala od: 775 – 800  $\mu\text{l}$  100 mM K–P pufera (pH 7.8); 50  $\mu\text{l}$  0.1 mM EDTA; 50  $\mu\text{l}$  3.0 mM L–metionina; 50  $\mu\text{l}$  5.0 mM NBT (nitro-blue tetrasolium); 50  $\mu\text{l}$  2.0 mM riboflavina i 5 – 25  $\mu\text{l}$  uzorka. Reakcija je otpočinjala izlaganjem reakcione smeše osvetljenju od 30W pod fluorescentnom lampom, 15 min na temperaturi od 20 °C.

SOD aktivnost je određivana na osnovu kapaciteta ekstrakta da inhibira fotohemijsku redukciju NBT–a do formazana. Plava boja se pojavljivala tokom reakcije.

Apsorbanca na 540 nm je izmerena pomoću aparata *ELISA Micro Plate Reader* (LKB 5060–006). Kontrolna reakciona smeša je bila bez uzorka proteina. Jedna SOD jedinica (U) je definisana kao količina enzima neophodna da inhibira 50% NBT fotoredukcije u poređenju sa smešom bez uzorka proteina.

Aktivnost SOD se izražava u odnosu na koncentraciju ukupnih rastvorenih protein (U/mg). Sva merenja za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaza, peroksidaza i superoksid dismutaza su rađena u tri ponavljanja.

### 3.9. Nativna elektroforeza (*Native PAGE*)

Razdvajanje izoformi enzima je vršeno nativnom elektroforezom (*Native PAGE*) na poliakrilamidnom gelu. Za razdvajanje izoformi rastvorljivih ćelijskih proteina nadenaturišućom elektroforezom korišćen je poliakrilamidni gel koji sadrži *Separating gel* 7% (za 10 ml gela: 2.35 ml mix-a akrilamida 30% i bisakrilamida 0.8%, 4.8 ml vode, 2.8 ml 1.5M Tris-a pH= 8.8; 2.5 µl TEMED-a i 50 µl APS-a 10%) i *Stracking gel* 5% (za 4.5 ml gela: 0.75 ml mešavine akrilamida 30% i bisakrilamida 0.8%; 2.83 ml vode, 0.875 ml 1 M Tris-a pH= 8.2 µl TEMED-a i 45 µl APS-a 10%). Debljina gela bila je 1.5 mm. Elektroforeza je vršena u aparaturi za vertikalnu elektroforezu (SE 600 Ruby, Amersham Biosciences, USA), uz priključivanje aprata za hlađenje. Prilikom eelektroforeze korišćen je *Running buffer* (25 mM Tris, 192 mM glicin) pH=8.3. Detekcija aktivnosti svakog enzima rađena je sa tri ponavljanja.

Rađeno je razdvajanje izoenzima kataze (CAT, EC 1.11.1.6), superoksid dizmutaze (SOD, E.C. 1.15.1.1), pirogallol peroksidaze (POX, E.C. 1.11.7) u poliakrilamidnom gelu nadenaturišućom elektroforezom. Gelovi su fotografisani na transiluminatoru (UltraLum Inc, Gel Explorer-u, Exton, PA). Analiza gelova rađena je primenom grafičkog paketa Image.

Na gelove su nanošeni uzorci proteina (µg/uzorku) u sledećim koncentracijama: za analizu CAT (30 µg), POX (50 µg) i SOD (15 µg).

### **3.9.1. Detekcija aktivnosti pirogalol peroksidaze u gelu**

Razdvajanje izoenzima pirogalol peroksidaza izvršeno je prema metodi Rothe (2002), elektroforezom na 200 V u trajanju od 7 h. Ispiranje gelova vršeno je u 100 mM citratnom puferu pH=4.0, a potom su inkubirani oko 30 min u reakcionom puferu (100 mM citratni pufer, pH=4.0, 114  $\mu$ l  $H_2O_2$ , 126.1 mg pirogalola rastvorenog u 2 ml vode (finalna koncentracija pirogalola 10 mM)) do pojave traka. Reakcija nastaje između  $H_2O_2$  i pirogalola, gradi se purpurogalin, žuto-braon boje. Nakon inkubacije, gelovi su isprani vodom i čuvani u vodi.

### **3.9.2. Detekcija aktivnosti katalaze u gelu**

Razdvajanje izoenzima katalaze izvršeno je prema metodi Woodbury i saradnika (1971) elektroforezom, na 200 V, u trajanju od 18 h. Nakon elektroforeze gelovi su ispirani dejonizovanom vodom 30 sekundi. Potom su bili u 2% rastvoru  $K_3Fe(CN)_6$  u periodu od 30 s, a zatim je u ovaj rastvor dodata ista zapremina 2% rastvora  $FeCl_3$ .  $K_3Fe(CN)_6$  reaguje sa vodonik peroksidom (redukcija  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$ ). Dodavanjem  $FeCl_3$  dolazi do njegove reakcije sa  $Fe^{2+}$  i formiranja obojenog  $Fe_3[Fe^{III}(CN)_6]_2$ , pa gel postaje plavo-zelen. Na mestima na kojima je prisutna katalaza, koja vrši degradaciju  $H_2O_2$ , pojavljuju se bezbojne trake. Pojave bezbojnih traka dešava se u periodu od oko 2 min nakon dodavanja  $FeCl_3$ . Kada je kontrast boje traka i gela bio najbolji, reakcija je zaustavljena ispiranjem gelova vodom.

### **3.9.3. Detekcija aktivnosti superoksid dismutaza u gelu**

Metoda Beauchamp-a i Fridovich-a (1971) primenjivana je za razdvajanje izoenzima superoksid dismutaze elektroforezom na 200 V, u trajanju od 6.5 h. Gelovi su ispirani vodom, a zatim inkubirani 30 min: prvi u 1mM KCN u K-P puferu (inhibitor Cu/Zn-SOD izoformi), drugi u 5 mM  $H_2O_2$  u K-P puferu (inhibitor Cu/Zn-SOD i Fe-SOD izoformi), treći u K-P puferu (u kome su Cu/Zn-SOD, Fe-SOD i Mn-SOD izoforme aktivne). Nakon ovog inkubiranja, svi gelovi inkubirani su u esej reagensu (za 20 ml reagensa korišćeno je 4.4 mg NBT, 0.6 mg riboflavina, 80  $\mu$ l 250 mM EDTA, 4  $\mu$ l



TEMED-a i dopunjeno do 20 ml 100 mM K-P puferom pH 7.8 jedinica) 30 min, u mraku. Nakon ove inkubacije, gelovi su isprani vodom i osvetljavani su svetlošću neonske lampe do purpurno-ljubičaste boje, koja potiče od formiranog formazana. Na mestima aktivnosti SOD uočavale su se bezbojne trake. Pojava različitih SOD izoformi (Mn-SOD, Fe-SOD i Cu/Zn-SOD) konstatovana je poređenjem belih traka na ova tri gela. Gelovi su čuvani u rastvoru 50% glicerola.

### **3.10 Spektrofotometrijska kvantifikacija ukupnih prolina**

#### **3.10.1. Ekstrakcija slobodnih aminokiselina**

Za ekstrakciju slobodnih amino kiselina i prolina primenjivana je metoda Friedman (2004). Korišćeno je 250 mg biljnog materijala, dodato je po 0.5 ml metanola (HPLC čistoće), a nakon toga izvršena je homogenizacija. Uzorci su prebačeni u ependorfe od 2 ml i centrifugirani 2 min na  $14000\text{ g}^{-1}$ . Supernatant je odliven u nove ependorfe zapremine 2 ml, a nakon toga je dodato još 0.5 ml metanola u ependorfe sa talogom. Talog je resuspendovan, promešan na vorteksu i centrifugiran. U supernatant je dodato 2 ml hloroforma, kako bi se uklonili lipidi. U uzorke je zatim dodato 0.75 ml HPLC-vode i uzorci su ponovo centrifugirani da bi se odvojile faze. Gornja vodena faza je prebačena u nove ependorfe i uparena na vakuum koncentratoru. Nakon pripreme uzorci su čuvani u zamrzivaču na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.10.2. Određivanje prolina pomoću Ninhidrinske reakcije**

Pripremljeni uzorci su rastvoreni u  $125\text{ }\mu\text{l}$  vode. Za ninhidrinsku reakciju je potrebno  $20\text{ }\mu\text{l}$  uzorka i još  $20\text{ }\mu\text{l}$  za reakciju bez ninhidrina. Za pripremanje ninhidrinskog reagensa potrebno je odmeriti 35 mg ninhidrina i 10 ml etanola. Nakon toga su pripremljeni standardni rastvori prolina koncentracije: 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 5000, 10000, 15000 i 20000  $\mu\text{M}$ . Prolin sa ninhidrinom ima maksimum apsorpcije na 350 nm. Pored standardnih rastvora za proline, napravljeni su i standardni rastvori za glicin. Ova standardna kriva služi za određivanje ukupnih aminokiselina, koje sa ninhidrinom daju plavu boju. Merena je apsorbanca na 570 nm.

**Reakcija:** 20  $\mu$ l uzorka (ili standarda) je pomešano sa 50  $\mu$ l ninhidrin reagensa, endorfe su dobro zatvorene i inkubirane 4 min u ključaloj vodi, dok ne postanu tamno plave. Zatim je dodato 930  $\mu$ l etanola, uzorci su promešani i merena je apsorbanca na 350 i 570 nm.

Kako i druge supstance apsorbuju na 350 nm kao i smeša prolina i ninhidrina, neophodno je bilo odrediti i apsorbanu uzoraka bez ninhidrina. Za reakciju bez ninhidrina potrebno je 20  $\mu$ l uzorka i 50  $\mu$ l etanolal, a nakon dobijanja smeše uzorci su inkubirani 4 min na 100 °C. Kada su urađene sve reakcije sa ninhidrinom i paralelno bez ninhidrina, za sve uzorke merena je apsorbanca na 350 i 570 nm, a koncentracija, koja se izražava u  $\mu$ M, se određuje iz standardnih krivih. Merenje apsorbance rađeno je na mikrotitar ploči, tako što je u svaki bunarić dodato po 20  $\mu$ l reakcione smeše.

$$\text{Koncentracija prolina} = \text{koncentracija SA ninhidrinom} - \text{koncentracija BEZ ninhidrina} \\ (\mu\text{M})$$

Za prolin i za ukupne aminokiseline se računa koliko ima  $\mu$ mol-ova u 500  $\mu$ l ekstrakta, odnosno u 1 g sveže mase.

### **3.11. Analiza fenolnih jedinjenja i određivanje antioksidacionog kapaciteta biljaka**

#### **3.11.1. Određivanje količine ukupnih fenolnih jedinjenja (Folin – Ciocalteu test)**

Folin–Ciocalteu test (FC test) služi za određivanje sadržaja ukupnih fenola u biljnom materijalu. Metoda se zasniva na činjenici da polifenoli u biljnom ekstraktu reaguju sa Folin– Ciocalteu reagensom (redoks reagens, smeša fosfolframove kiseline i fosfomolibdenske kiseline), pri čemu formiraju plavo obojeni kompleks koji se spektrofotometrijski može kvantifikovati (Schofield *et al.*, 2001; Blainski *et al.*, 2013).

Za dobijanje etanolnog ekstrakta koji će biti korišćen za ovaj test korišćeno je 200 mg biljnog materijala. Materijal je sprашen u tečnom azotu, a nakon sprашivanja u avan je dodato 2 ml etanola. Nakon dobijanja ekstrakta, sadržaj iz avana je prebačen u endorfe zapremine 2 ml. Tako pripremljene endorfe sa ekstraktima su se tokom 60 min inkubirale na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije uzoraka izvršeno je centrifugiranje 15 min na 12000  $\text{g}^{-1}$ . Nakon centrifugiranja odliven je supernatant, koji je korišćen u daljim analizama.

Protokol za Folin –Ciocalteu test:

Pre početka testa potrebno je napraviti rastvor Folin–Ciocalteu reagensa koji je napravljen tako što se u jednu zapreminu reagensa dodaju dve zapremine destilovane vode. Zatim se u prethodno obeležene ependorfe doda 300 µl FC reagensa i 1340 µl dejonizovane vode. Nakon toga dodato je 60 µl uzorka i ependorfe su uz blago vorteksovanje ostavljene da stoje na sobnoj temperaturi 5 min. Po isteku tog vremena u ependorfe je dodat 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Ependorfe su zaštićene od svetlosti i ostavljene 90 min na sobnoj temperaturi. Nakon isteka inkubacije, merena je apsorbanca na 765 nm. Kao slepa proba korišćena je smeša, gde je umesto uzorka korišćen etanol, a kao blank za ovu reakciju korišćen je 96% etanol.

### **3.11.2. Određivanje antioksidacionog kapaciteta biljaka (DPPH test)**

DPPH radikal (1.1-difenil-2-pikrilhidrazil) je stabilan radikal sa maksimumom apsorpcije na 520nm. Reakcijom antioksidanasa, stabilni DPPH· radikali se transformišu u 1.1-difenil-2-(2,4,6-trinitrofenil)-hidrazin.

Pre početka rada napravljen je DPPH rastvor koga su činili 4.5 mg DPPH i 45 ml metanola, pa je nakon toga izmerena je apsorbanca rastvora na 520 nm. Reakciona smeša za DPPH metodu sadržala je 400 µl 1.1-difenil-2-pikrilhidrazila koji je rastvoren u metanolu i čija je apsorbanca iznosila 2.5. Pored 1.1-difenil-2-pikrilhidrazila, reakcionu smešu su činili 100 µl uzorka (biljnog ekstrakta koji je pripremljen na isti način kao i uzorci za Folin – Ciocalteu test), kao i 500 µl metanola. Reakciona smeša je inkubirana 60 min na sobnoj temperaturi, u uslovima mraka, da bi se odigrala reakcija redukcije DPPH· radikala. Step en redukcije DPPH· radikala je odrađen merenjem apsorbanca na 520 nm, uz tri ponavljanja za svaki uzorak. Kao standard korišćen je derivat vitamina E rastvorljiv u vodi – troloks, tj. 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhromat-2-karboksilna kiselina.

### **3.11.3. UHPLC/-HESI-MS/MS (Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom sa MS/MS masenom spektrofotometrijom) analiza fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima**

Hromatografsko razdvajanje standarda fenola i ekstrakata mahovina, urađeno je na Dionex Ultimate 3000 UHPLC sistemu (Thermo Fisher Scientific, Bremen,

Nemačka) koji poseduje binarnu pumpu, vakuum degaser, termostat za kolone i auto-sampler. Hypersilgold C18 kolona dimenzija 50 x 2.1 mm, sa česticama veličine 1.9  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher Scientific, USA), korišćena je u analizama za hromatografsko razdvajanje. Mobilna faza se sastojala od 0.01% rastvora sirćetne kiseline (A) i acetonitrila (B), a uzorci su eluirani prema sledećem gradijentu: 5-20% B u prva 3 min; 20-40% B od 3 do 5 min, 40-50% B od 5 do 7.5 min, 50-60% B u periodu od 7.5 do 8.5 min, 60-95% B od 8.5 do 10.5 min, 95% B do 11.5 min, 95-5% B od 11.5 do 12 min, i na kraju 5% B do 15 min. Protok je podešen na 0.400 ml min<sup>-1</sup>, dok je kolona termostatorirana na 30°C. Injekciona zapremina iznosila je 15  $\mu\text{l}$ . Sve analize su urađene sa rastvorima MS čistoće (Fisher Scientific UK, Leics, UK). Za kontrolu UHPLC instrumenta je korišćen Chromeleon Xpress softver (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka).

UHPLC sistem je konfigurisan sa triple-quadru pole masenim spektrofotometrom (TSQQ u antum AccessMAX, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Nemačka) sa elektronsprej jonizacijom (HESI, eng. *Heated electrospray ionization*). Temperatura jonske probe (eng. *vaporizertemperature*) masenog spektrofotometra (TSQQ uantum Access Maxtriple-quadrupole mass spectrophotometer) je podešena na 350°C. HESI proba je podešena na sledeće parametre: voltaža 3500 V, pritisak nosećeg gasa (N<sub>2</sub>) 28 AU (arbitrarne jedinice; eng. *arbitraryunits*), pritisak gasa u jonskom izvoru 0 AU, pritisak auksilarnog gasa 4 AU, temperatura kapilare 270 °C, podešavanje jonskih sočiva 55 V. Podaci dobijeni na masenom spektrofotometru su praćeni u negativnom modalitetu, u opsegu  $m/z$  od 100 do 1000. U eksperimentima fragmentacije, disocijacija molekula je indukovana kolizijom (CID, eng. *collision-induced dissociation*), pri čemu je energija kolizione ćelije podešena na 30 eV.

Standardi kafeinske kiseline, p-kumarne kiseline, rutina, izokvercitrina, astragalina, apigetrina, naringenina, apigenina i kampferola su nabavljeni od Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka). Razblaženja standarda su pripremljena rastvaranjem u metanolu, u opsegu koncentracija 1 ng ml<sup>-1</sup> do 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

### 3.12. Analiza sadržaja šećera HPLC - PAD metodom

Po 20 mg svakog uzorka je ekstrahovano sa po 1 ml metanola tokom 1 h. Supernatant koji je dobijen nakon centrifugiranja tokom 15 min brzinom  $13000\text{ g}^{-1}$ , korišćen je za dalje analize.

Rastvorljivi šećeri su identifikovani i kvantifikovani metodom tečne hromatografije pod visokim pritiskom sa pulsnom amperometrijskom detekcijom (HPLC-PAD). Koncentracije glukoze, fruktoze i saharoze su preračunate na osnovu površine njihovih pikova, a kao standardi su korišćene čiste supstance (Sigma Co. St. Luis, MO). Analize su urađene Waters Breeze hromatografskim sistemom (Waters, Milford, MA), koji je snabdeven elektrohemijским detektorom (Waters 2465) sa zlatnom random elektrodom prečnika 3 mm i vodoničnom referentnom elektrodom. Za mobilnu fazu korišćen je 0.2M NaOH. Za pripremanje 0.2 M rastvora NaOH korišćen je rastvor NaOH (50% w/w, sa niskim sadržajem karbonata, J.T. Baker, Deventer, Holandija) i dejonizovana voda. Razdvajanje šećera je izvršeno korišćenjem CarboPac PA1 (Dionex, Sunnyvale, CA) kolone (250 x 4mm) koja je povezana sa odgovarajućom CarboPac PA1 predkolonom.

Šećeri su eluirani tokom 20 min, pri protoku od  $1\text{ ml min}^{-1}$ , na konstantnoj temperaturi od  $30^{\circ}\text{C}$ . Signali su detektovani u pulsnom modu sa sledećim oblikom signala:  $E_1 = +0.05\text{ V}$  tokom 400 ms;  $E_2 = +0.75\text{ V}$  tokom 200 ms;  $E_3 = -0.15\text{ V}$  tokom 300 ms i u okviru 180 ms integrativnog vremena. Vremenska skala filtera je 0.2 s i opseg od 200 – 500 nA za celu mV skalu. Analize za svaki uzorak su urađene u tri ponavljanja. Vrednosti su izražene u jedinicama mmol šećera na 100 g suve mase.

### 3.13. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišćen je softver STATISTICA. Podaci su podrvgnuti analizi varijanse (ANOVA), a poređenja između srednjih vrednosti su urađena pomoću Fisherovog LSD *post-hoc* testa, sa nivoom statističke značajnosti od  $p \leq 0.05$ . Finalna grafička obrada podataka urađena je pomoću ORIGIN 6.0 (OriginLab Corporation 1991-2002, USA). Prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti izračunate na osnovu tri tehnička ponavljanja.



# *REZULTATI*



## 4. REZULTATI

### 4.1. Uspostavljanje *in vitro* kulture vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*

Za uspostavljanje *in vitro* kulture vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* korišćeni su gametofiti i sporofiti.

Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da sterilizacija biljnog materijala u etanolu dovodi do brzog propadanja hlorofila i stoga je etanol poguban za sterilizaciju gametofita. Slični rezultati su dobijeni i u slučaju uspešne sterilizacije sporofita kada je kao sredstvo za sterilizaciju korišćen etanol. Korišćenjem kombinacije etanola i NaOCl prilikom sterilizacije, stopa preživljavanja je takođe bila veoma niska (Tabela 9). Kada je kao sredstvo za sterilizaciju korišćen etanol ili smesa etanola i NaOCl nije došlo do klijanja spora nakon sterilizacije.

Sterilizacija biljnog materijala, u kome su korišćene različite koncentracije NaOCl, daje bolji rezultat kada je u pitanju sterilizacija sporofita. Stopa preživljavanja se kretala od 33-90% u zavisnosti od primenjene koncentracije NaOCl. Preživljavanje gametofita, nakon sterilizacije različitim koncentracijama NaOCl kretalo se u intervalu od 2-11%.

Najbolji rezultati u pogledu preživljavanja spora i odsustva kontaminacije dala je sterilizacija pomoću 3% NaOCl, gde su spore sterilisane tokom 90 sekundi. Nakon sterilizacije od 90 sekundi spore su ispirane u destilovanoj vodi i stavljene na hranljivu podlogu. Na osnovu tabele uočava se da je stopa preživljavanja iznosila 90%.

Upotreba NaDCC kao sredstva za sterilizaciju gametofita ili sporofita, je efikasnija u sterilizaciji sporofita. Procenat proklijalih spora kretao se u intervalu od 66-80%. Najveći procenat preživljavanja sporofita od 80% je bio pri tretmanu od 3% NaDCC i vremenu izlaganja od 90 sekundi. Preživljavanje gametofita kretalo se u intervalu od 30-66%, a najveće preživljavanje zabeleženo je kao i za sporofit, pri tretmanu od 3% NaDCC i vremenu izlaganja od 90 sekundi. Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 8) možemo zaključiti da je za sterilizaciju gametofita najbolje koristiti 3%NaDCC, jer se pri tom tretmanu dobija najveći procenat preživelih biljaka.

**Tabela 8.** Uticaj različitih hemikalija (etanol, NaOCl i NaDCC) i vremena izlaganja biljnog materijala sterilizaciji na procenat preživljavanja gametofita i sporofita kod vrste *E. hungaricus*

| Hemikalija za sterilizaciju | Vreme izlaganja početnog materijala (s) | Preživljavanje gametofita nakon sterilizacije (%) | Preživljavanje sporofita nakon sterilizacije (%) |
|-----------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 1% NaOCl                    | 90                                      | 0                                                 | 0                                                |
| 3% NaOCl                    | 90                                      | 11                                                | 90                                               |
| 5% NaOCl                    | 90                                      | 7                                                 | 70                                               |
| 7% NaOCl                    | 90                                      | 2                                                 | 63                                               |
| 10% NaOCl                   | 60                                      | 8                                                 | 75                                               |
| 10% NaOCl                   | 90                                      | 0                                                 | 48                                               |
| 10% NaOCl                   | 120                                     | 2                                                 | 45                                               |
| 13% NaOCl                   | 90                                      | 0                                                 | 33                                               |
| 30% EtOH                    | 90                                      | 0 (100% letalno)                                  | 0                                                |
| 50% EtOH                    | 90                                      | 0 (100% letalno)                                  | 0                                                |
| 70% EtOH                    | 90                                      | 0 (100% letalno)                                  | 0                                                |
| 1% NaOCl + 10%EtOH          | 90                                      | 0 (100% letalno)                                  | 0                                                |
| 3% NaOCl + 10%EtOH          | 90                                      | 0 (100% letalno)                                  | 0                                                |
| 5% NaOCl + 10%EtOH          | 90                                      | 0 (100% letalno)                                  | 0                                                |
| 7% NaOCl + 10%EtOH          | 90                                      | 0 (100% letalno)                                  | 0                                                |
| 10% NaOCl + 10%EtOH         | 90                                      | 0 (100% letalno)                                  | 0                                                |
| 13% NaOCl + 10%EtOH         | 90                                      | 0 (100% letalno)                                  | 0                                                |
| 1% NaDCC                    | 90                                      | 48                                                | 69                                               |
| 3% NaDCC                    | 60                                      | 55                                                | 72                                               |
| 3% NaDCC                    | 90                                      | 66                                                | 80                                               |
| 3% NaDCC                    | 120                                     | 30                                                | 66                                               |
| 5% NaDCC                    | 90                                      | 37                                                | 66                                               |

Kada je u pitanju sterilizacija početnog materijala vrste *H. heimii* korišćeni su samo sporofiti. Sterilizacija je obavljena na isti način kao i za vrstu *E. hungaricus*. Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 9) uočava se kada je kao sredstvo za sterilizaciju korišćen etanol ili smesa etanola i NaOCl. Kod sporofita koji su tretirani samo NaOCl, preživljavanje sporofita je nisko i zavisi od vremena izlaganja hemikaliji za sterilizaciju. Najveći procenat preživelih je pri tretmanu od 5% NaOCl i vremenu izlaganja od 90 sekundi.



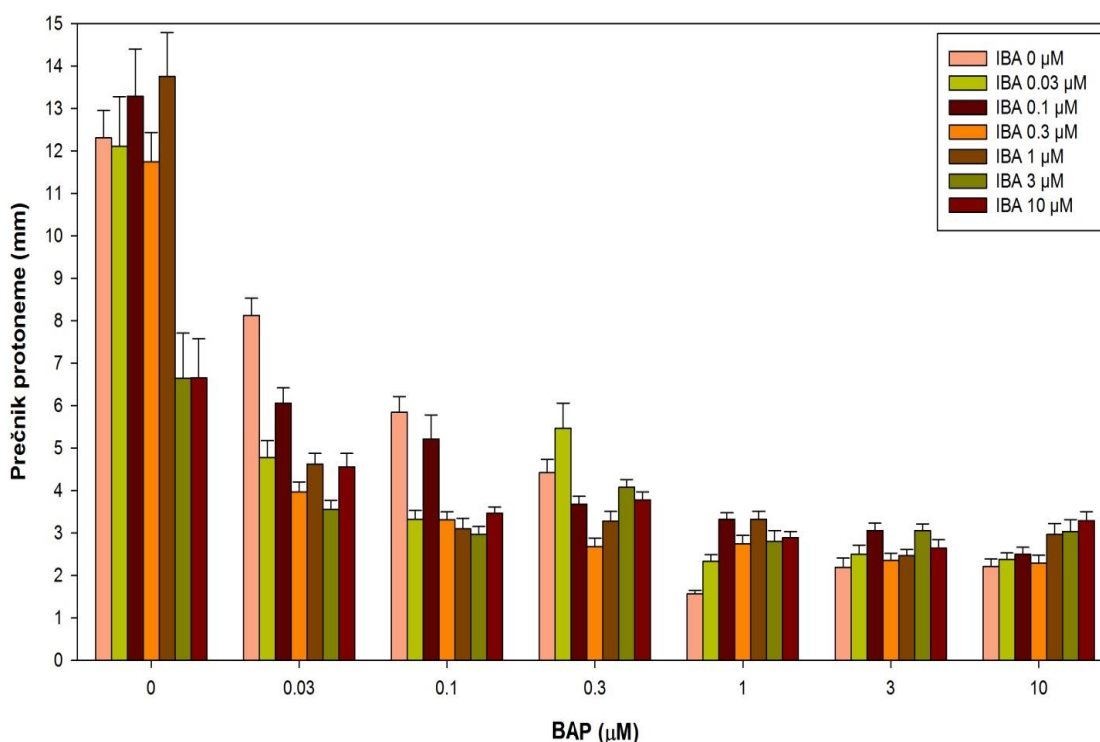
Na osnovu dobijenih rezultata kao najbolje sredstvo za sterilizaciju sporofita vrste *H. heimii* pokazao se NaDCC. Pri tretmanu od 3% NaDCC i vremenu izlaganja od 120 sekundi, najveći je procenat preživelih sporofita (45%)

**Tabela 9.** Uticaj različitih hemikalija (etano, NaOCl i NaDCC) i vremena izlaganja biljnog materijala sterilizaciji na procenat preživljavanja gametofita i sporofita kod vrste *H. heimii*

| Hemikalija<br>za sterilizaciju | Vreme izlaganja<br>početnog<br>materijala (s) | Preživljavanje gametofita<br>nakon sterilizacije<br>(%) | Preživljavanje<br>sporofita nakon<br>sterilizacije<br>(%) |
|--------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1% NaOCl                       | 90                                            | -                                                       | 0                                                         |
| 3% NaOCl                       | 90                                            | -                                                       | 16                                                        |
| 5% NaOCl                       | 90                                            | -                                                       | 19                                                        |
| 7% NaOCl                       | 90                                            | -                                                       | 18                                                        |
| 10% NaOCl                      | 60                                            | -                                                       | 9                                                         |
| 10% NaOCl                      | 90                                            | -                                                       | 8                                                         |
| 10% NaOCl                      | 120                                           | -                                                       | 8                                                         |
| 13% NaOCl                      | 90                                            | -                                                       | 3                                                         |
| 30% EtOH                       | 90                                            | -                                                       | 0                                                         |
| 50% EtOH                       | 90                                            | -                                                       | 0                                                         |
| 70% EtOH                       | 90                                            | -                                                       | 0                                                         |
| 1% NaOCl +<br>10%EtOH          | 90                                            | -                                                       | 0                                                         |
| 3% NaOCl +<br>10%EtOH          | 90                                            | -                                                       | 0                                                         |
| 5% NaOCl +<br>10%EtOH          | 90                                            | -                                                       | 0                                                         |
| 7% NaOCl +<br>10%EtOH          | 90                                            | -                                                       | 0                                                         |
| 10% NaOCl +<br>10%EtOH         | 90                                            | -                                                       | 0                                                         |
| 13% NaOCl +<br>10%EtOH         | 90                                            | -                                                       | 0                                                         |
| 1% NaDCC                       | 90                                            | -                                                       | 18                                                        |
| 3% NaDCC                       | 60                                            | -                                                       | 22                                                        |
| 3% NaDCC                       | 90                                            | -                                                       | 27                                                        |
| 3% NaDCC                       | 120                                           | -                                                       | 45                                                        |
| 5% NaDCC                       | 90                                            | -                                                       | 41                                                        |

#### 4.2. Uticaj egzogeno dodatih hormona (IBA i BAP) na morfogenezu vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*

Praćen je uticaj biljnih hormona IBA i BAP, kao esencijalnih u procesu rastenja i razvića, tokom morfogeneze mahovine *E. hungaricus* u *in vitro* uslovima. Ispitan je uticaj različitih koncentracija pojedinačnih hormona, kao i zbirno delovanje dva hormona (odabranih auksina i citokinina) na morfogenezu mahovine *E. hungaricus*, praćenjem sledećih parametara: prečnik protoneme i indeks mutiplikacije tokom šest nedelja.



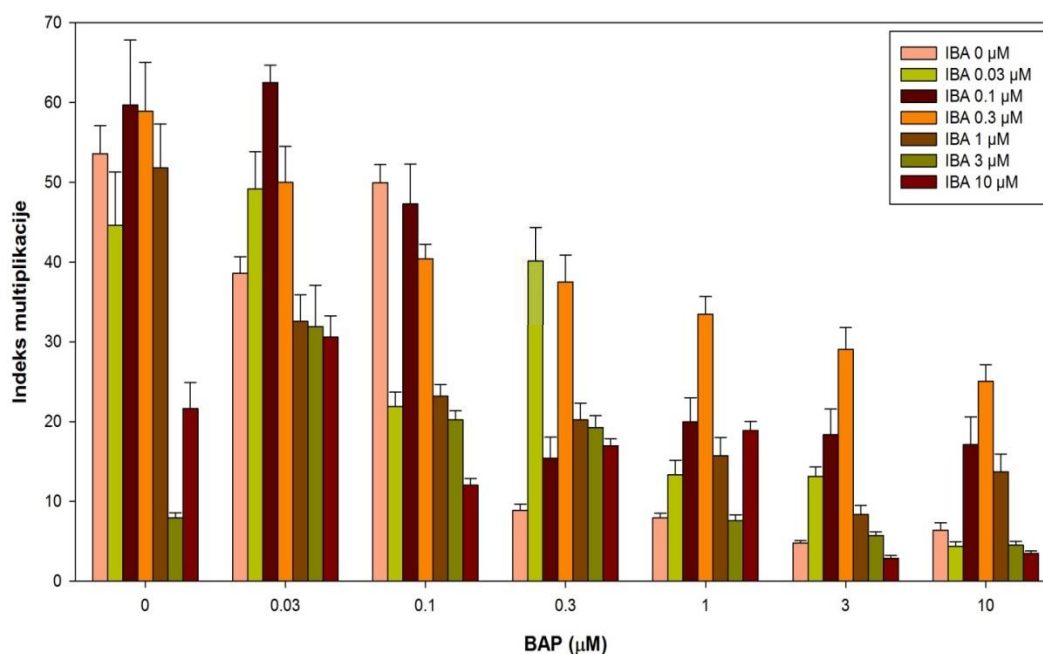
**Grafik 1.** Uticaj egzogeno dodatih IBA i BAP na razviće sekundarne protoneme vrste *E. hungaricus* (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ )).

Na osnovu dobijenih rezultata možemo uočiti da je najbolje razviće protoneme na medijumu u koji je dodata samo IBA, bez prisustva BAP. Prečnik protoneme je najveći kada su biljke rasle na niskim koncentracijama IBA (1  $\mu\text{M}$ ) (slika 19), dok u slučaju kada su rasle na višim koncentracijama (3 i 10  $\mu\text{M}$  IBA) dolazi do pada vrednosti prečnika protoneme.



**Slika 19.** Izgled sekundarne protoneme kod vrste *E. hungaricus* na hranljivoj podlozi sa dodatkom 1  $\mu\text{M}$  IBA

Na medijumu gde su egzogeno dodate različite koncentracije BAP uočava se da porastom koncentracije BAP trend opadanja prečnika protoneme sa porastom koncentracije BAP. Najmanja vrednost prečnika protoneme dobijena je na hranljivom medijumu gde je dodat BAP koncentracije 1  $\mu\text{M}$ . Egzogenim dodatkom oba hormona u hranljivi medijum, najveći prečnik protoneme dobijen je pri kombinaciji hormona od 0.03  $\mu\text{M}$  IBA i 0.3  $\mu\text{M}$  BAP. Na osnovu ANOVA analize dobijenih podataka, pokazano je da na prečnik protoneme najveći uticaj ima primenjena koncentracija BAP.



**Grafik 2.** Uticaj egzogeno dodatih IBA i BAP na indeks multiplikacije vrste *E. hungaricus* (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška (n=3)).

Na osnovu dobijenih rezultata najveći indeks multiplikacije uočava se kod biljaka raslih na hranljivom medijumu u koji je egzogeno dodata IBA koncentracije 0.1  $\mu\text{M}$  i BAP koncentracije 0.03  $\mu\text{M}$  (slika 20). Visoke vrednosti indeksa multiplikacije su prisutne i kod eksplantata gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom IBA koncentracije 0.1 i 0.3  $\mu\text{M}$ , bez prisustva BAP. Vrednost indeksa multiplikacije je preko 60 pupoljaka po početnom eksplantatu.



**Slika 20.** *In vitro* kultura vrste *E. hungaricus* gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 0.1  $\mu\text{M}$  IBA i 0.03  $\mu\text{M}$  BAP

Najniže vrednosti indeksa multiplikacije su zabeležene na podlozi gde su dodate visoke koncentracije i IBA i BAP. Na medijumu gde je egzogeno dodat samo BAP uočava se da povećanjem koncentracije BAP dolazi do smanjenja broja pupoljaka. Broj novoformiranih pupoljaka na visokim koncentracijama BAP ( 3 i 10  $\mu\text{M}$ ) kreće se od 5-7 po početnom eksplantatu (slika 21).



**Slika 21.** *In vitro* kultura vrste *E. hungaricus* gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 0.03  $\mu\text{M}$  BAP

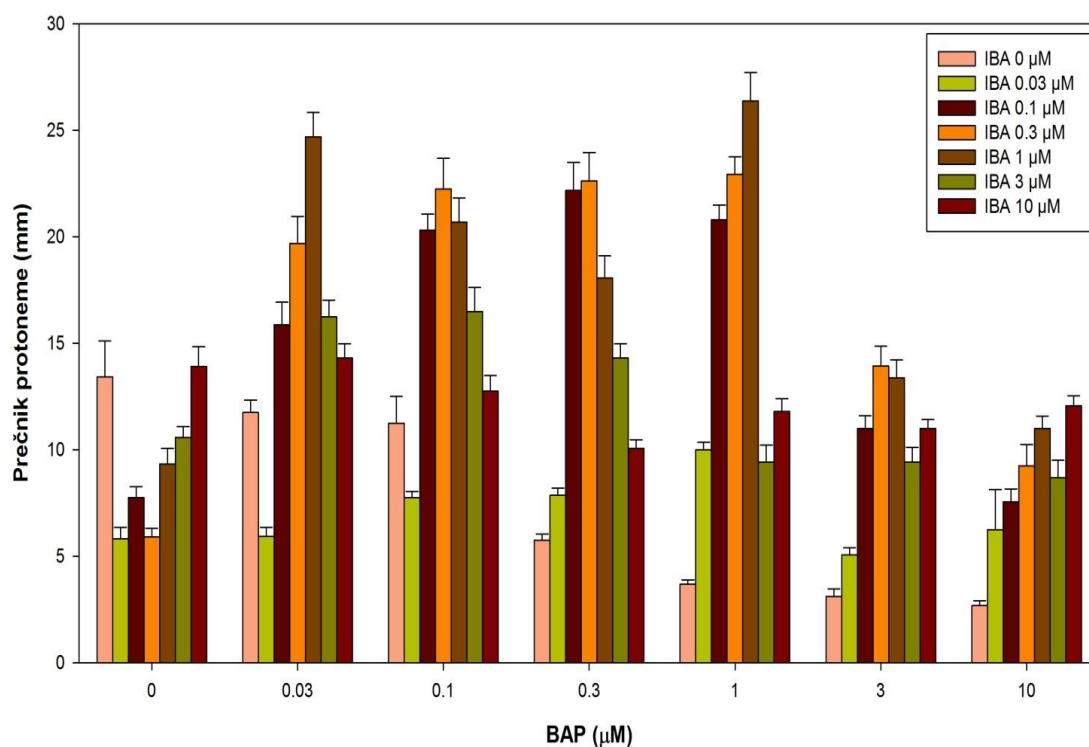
Kod biljaka raslih na medijumu gde je egzogeno dodata samo IBA može se uočiti da je najveći indeks multiplikacije (58 pupoljaka po eksplantatu) pri koncentraciji IBA od 0.1 - 3  $\mu\text{M}$ , dok na višim koncentracijama IBA vrednost indeksa multiplikacije značajno opada. Na osnovu rezultata prikazanih na grafiku 2, uočava se da u slučaju kada je egzogeno primenjena IBA koncentracije 0.3  $\mu\text{M}$  i različite koncentracije BAP (0-10  $\mu\text{M}$ ), vrednost indeksa multiplikacije linearno opada sa povećanjem koncentracije BAP. Sličan efekat ima i kombinacija IBA koncentracije 1  $\mu\text{M}$  sa različitim koncentracijama BAP (0-10  $\mu\text{M}$ ). Na osnovu statističkih analiza pokazano je da različite koncentracije BAP imaju najveći uticaj na indeks multiplikacije mahovine *E. hungaricus*, dok najmanji uticaj ima zajedničko delovanje IBA i BAP.

Na osnovu dobijenih rezultata prečnik protoneme kod vrste *H. heimii* kretao se u intervalu od 3-27 mm u zavisnosti od primenjene koncentracije hormona. Najveći prečnik protoneme uočava se kod biljaka *H. heimii* raslih na medijumu gde su egzogeno dodata oba hormona (1  $\mu\text{M}$  IBA i 1  $\mu\text{M}$  BAP) (Slika 22).



**Slika 22.** Izgled sekundarne protoneme vrste *H. heimii* rasle na hranljivoj podlozi sa dodatkom 1  $\mu\text{M}$  IBA i 1  $\mu\text{M}$  BAP

Najmanji prečnik protoneme zabeležen je kod biljaka raslih na medijumu gde je egzogeno dodat BAP koncentracije od 3 - 10  $\mu\text{M}$  (grafik 3). Povećanje koncentracije BAP dovodi do smanjenja prečnika protoneme. Pri koncentraciji IBA od 0.3 - 1  $\mu\text{M}$  i različitim koncentracijama BAP u intervalu od 0.03 - 1  $\mu\text{M}$  BAP dolazi do linearnog povećanja prečnika protoneme, a daljim povećanjem koncentracije BAP vrednost prečnika protoneme opada. U medijumu gde je egzogeno dodata samo IBA uočava se da porastom koncentracije IBA od 0.03 - 10  $\mu\text{M}$  prečnik protoneme ima linearan rast.



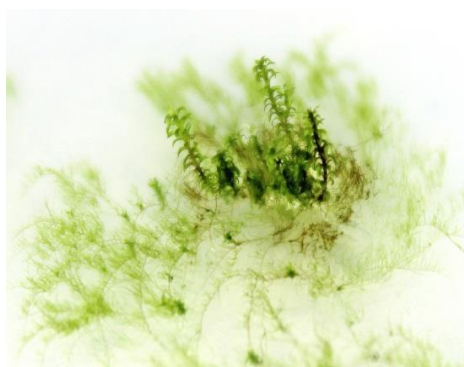
**Grafik 3.** Uticaj egzogeno dodatih IBA i BAP na razviće sekundarne protoneme vrste *H. heimii* (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška (n=3)).

Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 4) uočava se da visoka koncentracija IBA od 10  $\mu$ M ima presudan značaj za indeks multiplikacije, jer bez obzira na koncentraciju BAP, primena 10  $\mu$ M IBA značajnostimuliše pojavu pupoljaka na eksplantatima.

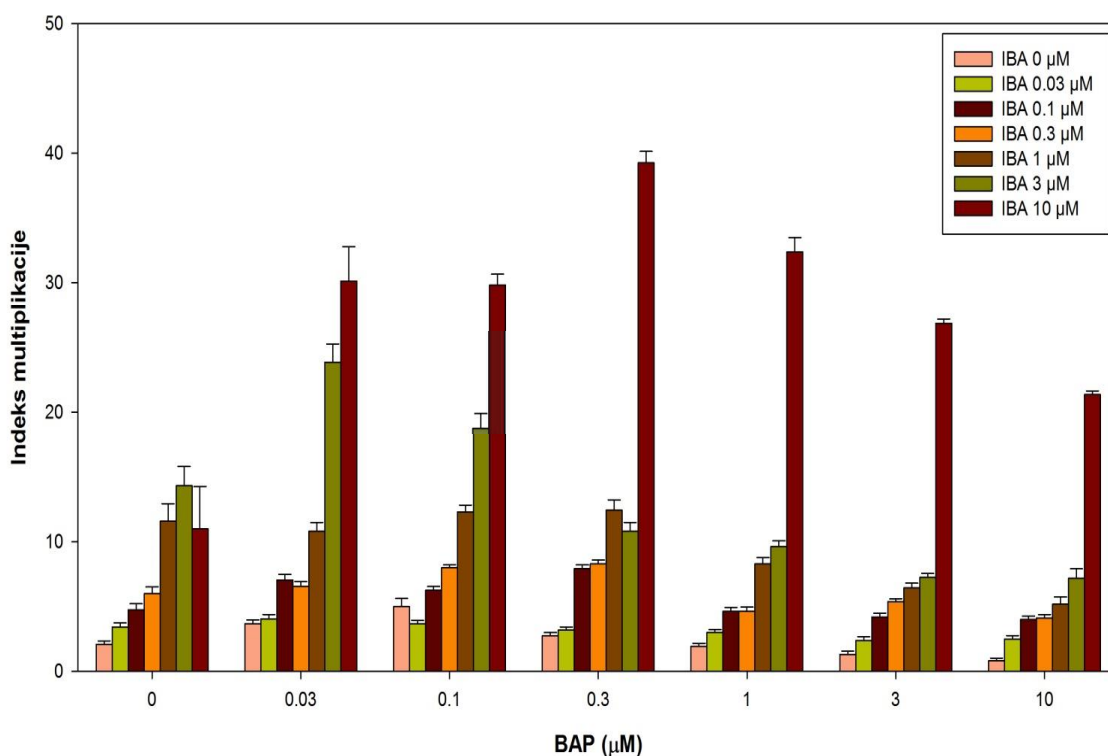


**Slika 23.** *In vitro* kultura vrste *H. heimii* rasle na hranljivoj podlozi sa dodatkom 10 $\mu$ M IBA

Hranljivi medijum u koga je egzogeno dodat samo BAP , nije optimalan medijum za umnožavanje pupoljaka vrste *H. heimii*. U kombinaciji BAP i IBA uočava se isti trend za sve primenjene koncentracije, gde povećanjem IBA od 0,03 do 10  $\mu\text{M}$  linearno raste broj pupoljaka. Optimalna kombinacija ovih hormona za umnožavanje pupoljaka vrste *H. heimii* jeste 0,3  $\mu\text{M}$  i 10  $\mu\text{M}$  IBA (slika 24).



**Slika 24.** *In vitro* kultura vrste *H. heimii* rase na hranljivoj podlozi sa dodatkom 0,3  $\mu\text{M}$  BAP i 10  $\mu\text{M}$  IBA



**Grafik 4.** Uticaj egzogeno dodatih IBA i BAP na indeks multiplikacije vrste *H. heimii* (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška (n=3)).

Ako se uporedi morfogeneza vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* može se uočiti da postoji različit trend formiranja pupoljaka i porasta prečnika protoneme pri istom dodatku pojedinačnih hormona ili kombinovanjem IBA i BAP. Kod vrste *E. hungaricus* povećanjem koncentracije IBA u kombinaciji sa BAP dovodi do smanjenja broja novoformiranih pupoljaka, dok je kod vrste *H. heimii* situacija obrnuta.

#### **4.3. Uloga egzogeno dodate apscisinske kiseline (ABA) na morfogenezu i sadržaj pigmenata kod odabranih predstavnika briofita**

Efekti apscisinske kiseline nisu dovoljno proučavani kod briofita. U ovom istraživanju ispitivan je uticaj predtretmana apscisinskom kiselinom različitih koncentracija na rastenje i razviće tri vrste briofita *P. patens*, *A. undulatum* i *M. polymorpha*. Praćena je morfogeneza biljaka u kulturi *in vitro* pod uticajem ABA, kao i količina fotosintetičkih pigmenata koji su jedan od bitnih pokazatelja fiziološkog stanja biljaka.

U ovu studiju uključene su tri filogenetski udaljene vrste, koje su prilagođene različitim uslovima životne sredine u kojoj žive. Vrsta *M. polymorpha* je vežana za vodu i nije tolerantna na nedostatak vode, dok je vrsta *A. undulatum* karakteristična za zasenjena staništa u šumama i može izdržati duže periode bez vode. Nasuprot ovim vrstama, vrsta *P. patens* je šatl vrsta koja brzo kolonizuje neko stanište, najčešće u blizini vodenih bazena i plavnim područjima. Ono što karakteriše ovu vrstu jeste brzo završavanje životnog ciklusa, što predstavlja adaptaciju na uslove životne sredine u kojoj se nalazi i izbegavanje konkurencije od drugih biljaka pomoću spora.

Indeks multiplikacije praćen je kod dve vrste *P. patens* i *A. undulatum*, dok kod vrste *M. polymorpha* nije bilo moguće izmeriti indeks multiplikacije zbog građe biljke.

Na osnovu prikazanih rezultata (tabela 10) uočava se da niska koncentracija ABA od 0.03  $\mu\text{M}$  ima stimulatoran efekat na stvaranje novih pupoljaka. Daljim povećavanjem koncentracije ABA dolazi do pada vrednosti indeksa multiplikacije za obe ispitivane vrste. ABA kao hormon stresa i inhibitor rasta na specifičan način inhibira razviće novih izdanaka kod ispitivanih vrsta.



Dobijeni rezultati za vrstu *A. undulatum* su u skladu sa opštim obrascima kod briofita (Verner *et al.*, 1991). Poznato je da egzogena ABA dovodi do inhibicija rasta protoneme, ali se povećava produkcija aseksualnih organa gema (Hartung & Gimmler 1994 ; Christianson, 2000b).

**Tabela 10.** Uticaj egzogeno dodate ABA na indeks multiplikacije vrsta *A. undulatum* i *P. patens*

| Vrsta               | Koncentracija ABA (μM) | Indeks multiplikacije     |
|---------------------|------------------------|---------------------------|
| <i>A. undulatum</i> | 0                      | 4.167 ± 0.41 <sup>b</sup> |
|                     | 0.03                   | 4.367 ± 0.64 <sup>b</sup> |
|                     | 0.1                    | 3.658 ± 0.50 <sup>b</sup> |
|                     | 1                      | 1.908 ± 0.14 <sup>a</sup> |
|                     | 3                      | 1.967 ± 0.14 <sup>a</sup> |
|                     | 10                     | 1.10 ± 0.12 <sup>a</sup>  |
|                     | 15                     | 1.080 ± 0.11 <sup>a</sup> |
| <i>P. patens</i>    | 0                      | 3.110 ± 0.38 <sup>a</sup> |
|                     | 0.03                   | 5.300 ± 0.28 <sup>c</sup> |
|                     | 0.1                    | 4.268 ± 0.26 <sup>b</sup> |
|                     | 1                      | 3.118 ± 0.37 <sup>a</sup> |
|                     | 3                      | 2.991 ± 0.11 <sup>a</sup> |
|                     | 10                     | 2.417 ± 0.36 <sup>a</sup> |
|                     | 15                     | 2.401 ± 0.34 <sup>a</sup> |

Ovim istraživanjem je potvrđena inhibicija rasta protoneme, jer ni kod jedne ispitivane vrste nije doslo do stvaranja sekundarne protoneme. Međutim, rast gametofita kod dve mahovine i talusa kod jedne jetrenjace nije inhibiran, on je na određenim koncentracijama samo usporen (tabela 11).

Kao bitan pokazatelj rasta i razvića biljaka jeste i produkcija biomase. U ovom istraživanju merena je biomasa biljaka koje su bile na hranljivoj podlozi sa dodatkom određene koncentracije ABA. Biomasa je merena kod sve tri ispitivane vrste.

**Tabela 11.** Uticaj egzogeno dodate ABA na biomasu vrsta *A. undulatum*, *P. patens* i *M. polymorpha*

| Vrsta                | Koncentracija ABA (μM) | Biomasa (g)                |
|----------------------|------------------------|----------------------------|
| <i>A. undulatum</i>  | 0                      | 0.078 ± 0.11 <sup>d</sup>  |
|                      | 0.03                   | 0.085 ± 0.002 <sup>c</sup> |
|                      | 0.1                    | 0.087 ± 0.01 <sup>b</sup>  |
|                      | 1                      | 0.148 ± 0.09 <sup>f</sup>  |
|                      | 3                      | 0.107 ± 0.07 <sup>c</sup>  |
|                      | 10                     | 0.082 ± 0.02 <sup>b</sup>  |
|                      | 15                     | 0.080 ± 0.02 <sup>b</sup>  |
| <i>M. polymorpha</i> | 0                      | 0.377 ± 0.11 <sup>d</sup>  |
|                      | 0.03                   | 0.390 ± 0.22 <sup>d</sup>  |
|                      | 0.1                    | 0.455 ± 0.09 <sup>c</sup>  |
|                      | 1                      | 0.304 ± 0.08 <sup>c</sup>  |
|                      | 3                      | 0.256 ± 0.08 <sup>b</sup>  |
|                      | 10                     | 0.166 ± 0.02 <sup>a</sup>  |
|                      | 15                     | 0.162 ± 0.02 <sup>a</sup>  |
| <i>P. patens</i>     | 0                      | 0.030 ± 0.001 <sup>a</sup> |
|                      | 0.03                   | 0.106 ± 0.05 <sup>c</sup>  |
|                      | 0.1                    | 0.114 ± 0.04 <sup>f</sup>  |
|                      | 1                      | 0.081 ± 0.01 <sup>c</sup>  |
|                      | 3                      | 0.098 ± 0.002 <sup>d</sup> |
|                      | 10                     | 0.073 ± 0.008 <sup>b</sup> |
|                      | 15                     | 0.070 ± 0.007 <sup>b</sup> |

Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 12), može se uočiti da niske koncentracije egzogeno dodate ABA povećavaju produktivnost biomase u odnosu na kontrolnu grupu biljaka. Na visokim koncentracijama ABA dolazi do pada vrednosti biomase za sve tri ispitivane vrste.

Fotosintetički pigmenti su još jedan od bitnih parametara, koji pokazuju fiziološko stanje biljaka. Merena je koncentracija hlorofila a, hlorofila b, ukupnih hlorofila, odnosa hlorofila a/b, kao i koncentracija ukupnih karotenoida.

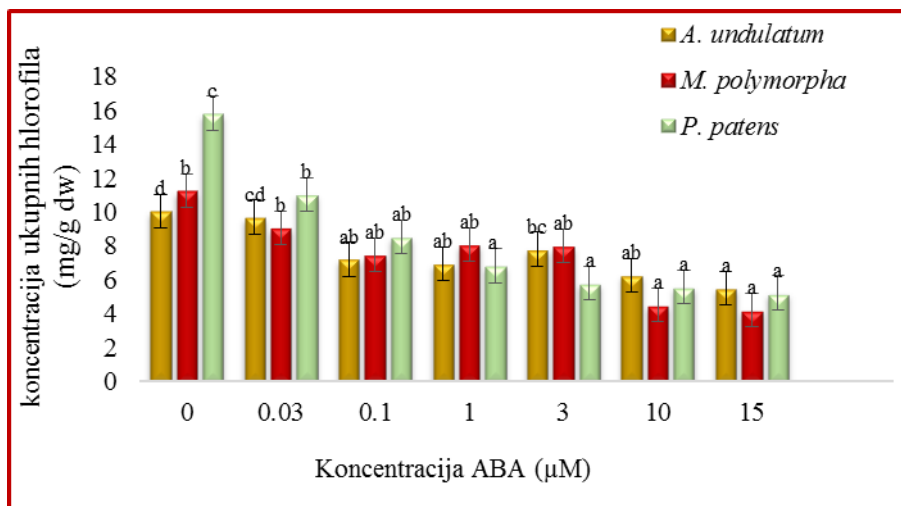
Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 12) uočava se da kod sve tri ispitivane vrste povećanjem koncentracije egzogeno dodate ABA dolazi do pada vrednosti kako pojedinačnih hlorofila, tako i odnosa hlorofila a/b. Kod vrsta *A. undulatum* i *P. patens* uočeno je da na niskim koncentracijama ABA dolazi do povećanja odnosa hlorofila a/b.

Kod vrste *A. undulatum* pri tretmanu ABA od 3  $\mu\text{M}$ , uočen je značajan porast koncentracije hlorofila b, kao i najniža vrednost odnosa hlorofila a/b za ovu vrstu.

**Tabela 12.** Efekat predtretmana apscisinskom kiselinom na koncentraciju hlorofila a, hlorofila b i odnos hlorofila a/b

| Vrsta                | Koncentracija ABA ( $\mu\text{M}$ ) | Količina hlorofila a (mg/g dw) | Količina hlorofila b (mg/g dw) | Odnos hlorofila a/b    |
|----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| <i>A. undulatum</i>  | 0                                   | $7.077 \pm 0.603^c$            | $2.987 \pm 0.301^{ab}$         | $2.407 \pm 0.275^b$    |
|                      | 0.03                                | $6.873 \pm 0.614^c$            | $2.823 \pm 0.199^{ab}$         | $2.433 \pm 0.116^b$    |
|                      | 0.1                                 | $5.243 \pm 0.058^b$            | $1.963 \pm 0.173^a$            | $2.700 \pm 0.202^b$    |
|                      | 1                                   | $4.807 \pm 0.484^{ab}$         | $2.150 \pm 0.297^a$            | $2.400 \pm 0.606^b$    |
|                      | 3                                   | $4.547 \pm 0.866^{ab}$         | $3.260 \pm 0.644^b$            | $1.423 \pm 0.184^a$    |
|                      | 10                                  | $4.157 \pm 0.296^{ab}$         | $2.120 \pm 0.243^a$            | $2.023 \pm 0.329^{ab}$ |
|                      | 15                                  | $3.507 \pm 0.341^a$            | $2.003 \pm 0.318^a$            | $1.787 \pm 0.118^{ab}$ |
| <i>M. polymorpha</i> | 0                                   | $6.143 \pm 1.169^b$            | $5.100 \pm 1.066^b$            | $1.210 \pm 0.044^a$    |
|                      | 0.03                                | $6.180 \pm 0.615^b$            | $2.880 \pm 0.105^a$            | $2.133 \pm 0.250^b$    |
|                      | 0.1                                 | $4.683 \pm 0.673^{ab}$         | $2.793 \pm 0.792^a$            | $1.920 \pm 0.918^{ab}$ |
|                      | 1                                   | $5.340 \pm 0.748^b$            | $2.757 \pm 0.230^a$            | $2.003 \pm 0.696^{ab}$ |
|                      | 3                                   | $5.153 \pm 0.650^b$            | $2.827 \pm 0.561^a$            | $1.873 \pm 0.227^{ab}$ |
|                      | 10                                  | $2.700 \pm 0.850^a$            | $1.840 \pm 0.721^a$            | $1.553 \pm 0.229^{ab}$ |
|                      | 15                                  | $2.613 \pm 0.804^a$            | $1.587 \pm 0.599^a$            | $1.820 \pm 0.427^{ab}$ |
| <i>P. patens</i>     | 0                                   | $10.040 \pm 1.215^c$           | $5.793 \pm 0.971^c$            | $1.753 \pm 0.076^{ab}$ |
|                      | 0.03                                | $6.957 \pm 1.069^b$            | $4.0967 \pm 0.578^b$           | $1.690 \pm 0.044^{ab}$ |
|                      | 0.1                                 | $5.080 \pm 0.839^{ab}$         | $3.457 \pm 0.719^{ab}$         | $1.510 \pm 0.115^a$    |
|                      | 1                                   | $4.467 \pm 0.280^a$            | $2.367 \pm 0.356^a$            | $1.943 \pm 0.204^b$    |
|                      | 3                                   | $3.520 \pm 0.446^a$            | $2.270 \pm 0.223^a$            | $1.547 \pm 0.127^a$    |
|                      | 10                                  | $3.283 \pm 0.378^a$            | $2.303 \pm 0.287^a$            | $1.433 \pm 0.081^a$    |
|                      | 15                                  | $3.080 \pm 0.355^a$            | $2.140 \pm 0.206^a$            | $1.430 \pm 0.055^a$    |

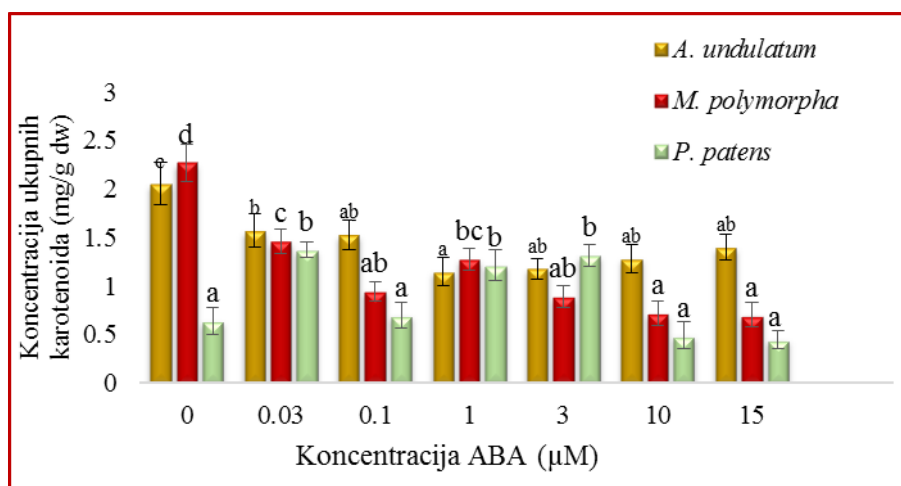
Na graficima 5 i 6 prikazana je ukupna koncentracija hlorofila i ukupna koncentracija karotenoida. Kod kontrolne grupe biljaka najviša koncentracija ukupnih hlorofila je kod vrste *P. patens*. Kod sve tri vrste se može uočiti linearan pad vrednosti ukupnih hlorofila povećanjem koncentracije egzogeno dodate ABA (grafik 5).



**Grafik 5.** Efekat predtretmana apscisinskom kiselinom na koncentraciju ukupnih hlorofila kod ispitivanih vrsta

Na osnovu rezultata (grafik 6) uočeno je da kod vrste *A. undulatum* poraqtom koncentracije ABA opada koncentracija ukupnih karotenoida, a da kod vrste *P. patens* dolazi do porasta koncentracije na najnižoj primenjenoj koncentraciji ABA u odnosu na kontrolnu grupu biljaka. Vrsta *M. polymorpha* beleži isti trend kao i vrsta *A. undulatum*.

Smanjivanje koncentracije fotosintetičkih pigmenata (hlorofila i karotenoida) pod uticajem ABA ukazuje, da su primenjene koncentracije ABA visoke za date vrste.



**Grafik 6.** Efekat predtretmana apscisinskom kiselinom na koncentraciju ukupnih karotenoida kod ispitivanih vrsta

#### 4.4. Uticaj stresa solima na morfogenezu mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimi* u uslovima *in vitro*

U proučavanju morfogeneze ispitivanih vrsta (*P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimi*), praćeni su sledeći parametri: preživljavanje, indeks multiplikacije i prečnik protoneme kod mahovina izlaganih stresu solima u uslovima *in vitro*, nakon tri dana i tri nedelje eksperimenta. Kontrolna grupa biljaka, predstavlja biljke koje su rasle na hranljivom medijumu bez dodatka soli (0 mM NaCl).

Na slici 25 prikazan je izgled biljaka sve tri ispitivane vrste gajene tokom tri nedelje na hranljivoj podlozi sa dodatkom različite koncentracije NaCl.

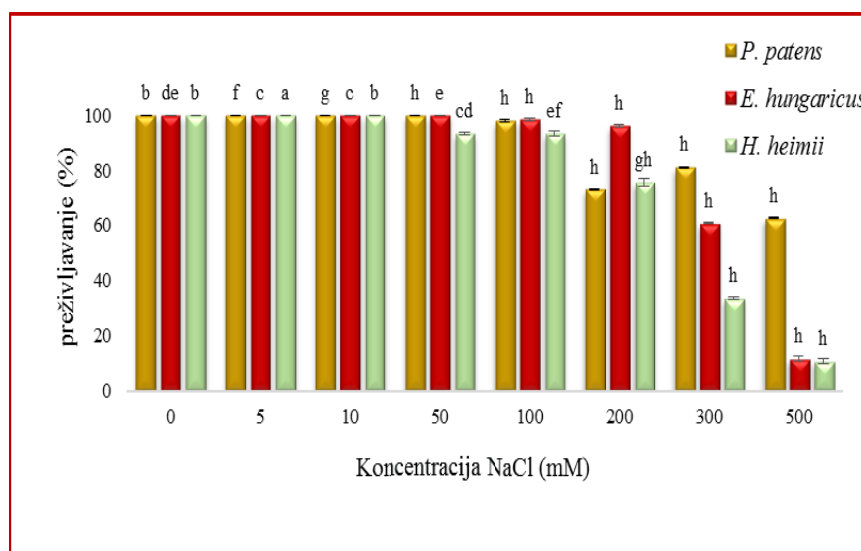


**Slika 25.** Izgled ispitivanih vrsta gajenih tri nedelje u kulturi *in vitro* na hranljivoj podlozi sa dodatkom različitih koncentracija soli

Kod biljaka koje su izlagane tri dana stresu solima nisu zabeležene kvalitativne i kvantitativne promene. Promene nisu uočene, jer period od tri dana predstavlja kratak vremenski interval u kome se mogu desiti vidljive i uočljive morfološke promene.

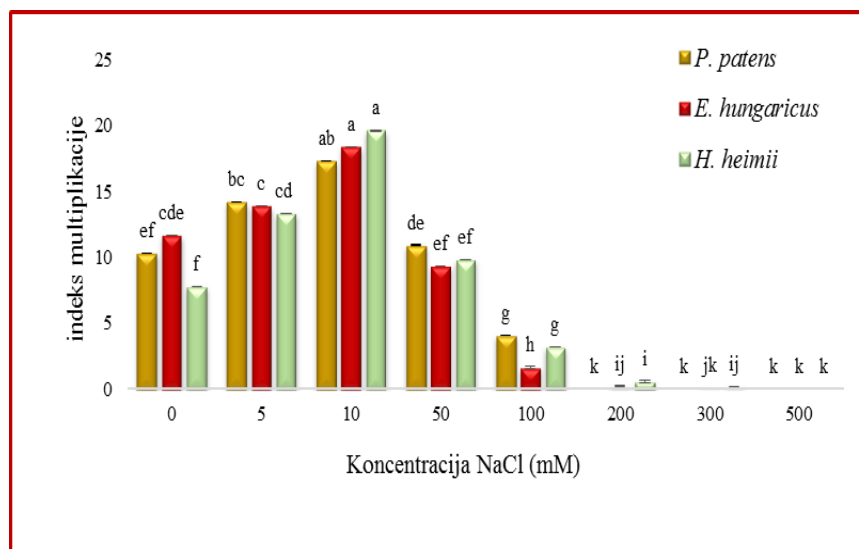
Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih na grafiku 7, može se uočiti da preživljavanje sve tri vrste opada linearno na najvišim primenjenim koncentracijama NaCl, počevši od 100 mM. Najveći pad preživljavanja zapažen je na najvećoj primenjenoj koncentraciji od 500 mM NaCl, gde kod vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* iznosi svega 10% . Ovakav trend je u izvesnoj meri očekivan, s obzirom da su vrste *E. hungaricus* i *H. heimii* fakultativni halofiti i poseduju određene mehanizme tolerancije i adaptacije na ispitivani stres, pa se mogu izboriti sa povećanom koncentracijom soli u podlozi.

Kod vrste *P. patens* preživljavanje na najvišim koncentracijama NaCl veće je u odnosu na druge dve ispitivane vrste (Grafik 7). Na hranljivom medijumu sa dodatkom 500 mM NaCl se uočava statistički značajno veće preživljavanje *P. patens* u odnosu na druge dve ispitivane vrste (vrednost preživljavanja 59%).



**Grafik 7.** Uticaj egzogeno dodatog NaCl na preživljavanje vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* tokom tri nedelje stresa solima. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

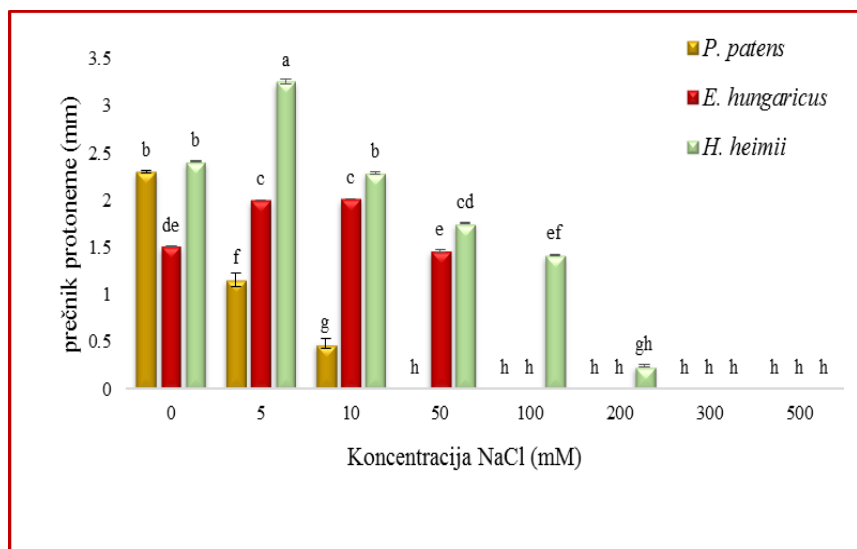
U uslovima stresa (pri visokim koncentracija soli) dolazi do smanjenja prosečnog broja novoformiranih pupoljaka (slika 25), odnosno smanjenog razvoja kauloida, filoida i bočnih grana. Ovakve promene se mogu primetiti na osnovu vrednosti indeksa multiplikacije, koje su prikazane na grafiku 8.



**Grafik 8.** Uticaj egzogeno dodatog NaCl na indeks multiplikacije vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* tokom tri nedelje stresa solima. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greska ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Uočeno je da pri tretmanima od 5 i 10 mM NaCl dolazi do statistički značajnog povećanja indeksa multiplikacije kod sve tri ispitivane vrste u odnosu na kontrolnu grupu biljaka (grafik 8). Niske koncentracije NaCl stimulišu formiranje novih izdanaka, što je jedan od pokazatelja prilagođenosti fakultativnih halofita na niske koncentracije soli. Na koncentracijama od 50 i 100 mM NaCl vrsta *P. patens* ima značajno veći indeks multiplikacije u odnosu na druge dve ispitivane vrste. Pri najvišim koncentracijama od 300 i 500 mM NaCl indeks multiplikacije je nula za vrste *P. patens* i *E. hungaricus*, dok je kod vrste *H. heimii* prisutno preživljavanje na podlozi sa dodatkom 300 mM NaCl. Tokom kratkotrajnog izlaganja stresu solima (tri dana), nije došlo do formiranja novih pupoljaka kod biljaka tretiranih NaCl, kao ni u kontrolnoj grupi biljaka.

Prečnik protoneme je još jedan od praćenih parametara morfogeneze tokom izlaganja biljaka stresu solima. Kod biljaka koje su rasle na hranljivom medijumu sa NaCl tokom tri dana (kratkotrajni stres) nije došlo do formiranja protoneme.



**Grafik 9.** Uticaj egzogeno dodatog NaCl na prečnik protoneme vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* tokom tri nedelje stresa solima (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greska ( $n=3$ ), Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 9) može se uočiti da je tokom dugotrajnog stresa solima kod vrste *P. patens* došlo do formiranja najvećeg prečnika protoneme kod kontrolne grupe biljaka, a da povećanjem koncentracije soli dolazi do linearnog pada vrednosti prečnika protoneme. Na koncentracijama većim od 10 mM NaCl ne formira se sekundarna protonema kod *P. patens*. Kod vrste *E. hungaricus* na niskim koncentracijama NaCl od 5 i 10 mM formira se protonema koja ima veći prečnik u odnosu na kontrolnu grupu biljaka. Vrednost protoneme kod kontrolne grupe biljaka je iznosila 1.5 mm, a kod biljaka raslih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 10 mM NaCl je 2 mm. Kod ove vrste na koncentracijama većim od 50 mM NaCl nije uočeno formiranje protonema.

Kod treće ispitivane vrste, *H. heimii*, može se uočiti da se protonema formira do koncentracije NaCl od 200 mM (grafik 9). Najveći prečnik protoneme je u slučaju kada su biljke rasle na hranljivoj podlozi sa 5mM NaCl, a vrednost prečnika protoneme iznosila je 3.3 mm. Daljim povećanjem koncentracije soli u hranljivoj podlozi dolazi do linearnog opadanja prečnika protoneme kod *H. heimii*. ANOVA testom je potvrđeno da



su dobijeni rezultati za sve morfogenetske parametre statistički značajni, i da presudnu ulogu ima primenjena koncentracija soli.

#### **4.5. Uticaj stresa solima na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u uslovima *in vitro***

Koncentracija fotosintetičkih pigmenata je jedan od bitnih pokazatelja stresa kod biljaka. U ovom radu praćena je koncentracija hlorofila (ukupni hlorofili, hlorofil a, hlorofil b i odnos hlorofila a/b), karotena (ukupni karoteni,  $\alpha$  karoten i  $\beta$  karoten), ksantofila (ukupni ksantofili, neoksantin, lutein, violaksantin, zeaksantin i anteraksantin), kao i količina ukupnih karotenoida.

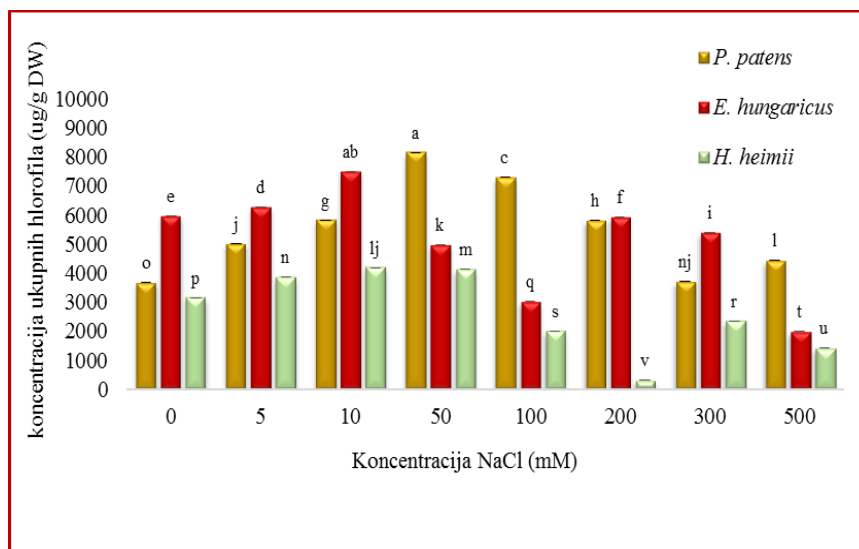
##### **4.5.1. Uticaj stresa solima na koncentraciju hlorofila kod biljaka izlaganih stresu solima**

Hlorofili kao glavni fotosintetički pigmenti su bitan pokazatelj stanja u kome se neka biljna vrsta nalazi. Koncentracija ukupnih hlorofila, kao i odnos hlorofila pokazuju kakvi su uslovi sredine u kojima određena vrsta raste i razvija se. Pad koncentracije ukupnih hlorofila govori o izmenjenim uslovima sredine, pre svega pod uticajem abiotičkih faktora kao što su povećan intenzitet svetlosti, vodni deficit, niske temperature i stres solima.

U tabeli 13 je prikazana koncentracija hlorofila a, hlorofila b, odnosa hlorofila a/b, kao i ukupnih hlorofila kod biljaka izlaganih tri dana stresu solima. Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da koncentracija hlorofila a i hlorofila b kod vrste *P. patens* raste na nižim koncentracijama soli u odnosu na kontrolu. Najmanja količina hlorofila a je prisutna kod vrste *H. heimii* u odnosu na druge dve ispitivane vrste. Kod ove vrste pri tretmanu solima od 200 i 500 mM NaCl uočava se da je količina hlorofila a manja u odnosu na količinu hlorofila b.

**Tabela 13.** Koncentracija hlorofila a, hlorofila b, ukupnih hlorofila i odnos hlorofila a/b kod mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* izlaganih tri dana stresu solima u kulturi *in vitro*. Koncentracija soli je izražena u mM, a koncentracija hlorofila a, hlorofila b i ukupnih hlorofila u µg/g DW.

| VRSTA                | konc. soli | hlorofil a     | hlorofil b     | odnos hlorofila a/b | ukupni hlorofili |
|----------------------|------------|----------------|----------------|---------------------|------------------|
| <i>P. patens</i>     | 0          | 2770,33 ± 1,77 | 905,20 ± 5,46  | 3,06 ± 8,61         | 33675,54 ± 5,31  |
|                      | 5          | 3653,06 ± 1,65 | 1363,96 ± 1,24 | 2,67 ± 5,24         | 5017,03 ± 9,50   |
|                      | 10         | 4353,89 ± 9,38 | 1478,76 ± 2,50 | 2,94 ± 6,68         | 5832,66 ± 9,33   |
|                      | 50         | 6127,88 ± 0,00 | 2026,33 ± 5,51 | 3,02 ± 4,38         | 8154,22 ± 0,00   |
|                      | 100        | 5289,23 ± 4,07 | 2009,49 ± 3,86 | 2,63 ± 2,33         | 7298,73 ± 6,64   |
|                      | 200        | 4141,46 ± 3,28 | 1671,47 ± 0,00 | 2,47 ± 1,00         | 5812,94 ± 0,00   |
|                      | 300        | 2668,27 ± 3,05 | 1033,82 ± 3,85 | 2,58 ± 2,09         | 3702,10 ± 6,29   |
|                      | 500        | 3471,27 ± 3,12 | 953,57 ± 0,00  | 3,64 ± 1,24         | 4424,85 ± 0,00   |
| <i>E. hungaricus</i> | 0          | 5059,02 ± 1,61 | 912,05 ± 4,99  | 5,54 ± 1,92         | 5971,07 ± 3,93   |
|                      | 5          | 4725,49 ± 2,87 | 1543,61 ± 0,00 | 3,06 ± 1,73         | 6269,11 ± 7,38   |
|                      | 10         | 5736,19 ± 4,59 | 1761,85 ± 9,14 | 3,25 ± 1,25         | 7498,05 ± 8,53   |
|                      | 50         | 3884,52 ± 1,54 | 1073,18 ± 7,75 | 3,61 ± 1,84         | 4957,71 ± 5,00   |
|                      | 100        | 2201,31 ± 2,77 | 814,98 ± 5,91  | 2,70 ± 8,51         | 3016,30 ± 6,81   |
|                      | 200        | 4735,70 ± 4,32 | 1197,80 ± 8,43 | 3,95 ± 1,14         | 5933,51 ± 9,99   |
|                      | 300        | 4053,48 ± 4,43 | 1344,13 ± 0,00 | 3,01 ± 2,92         | 5397,62 ± 0,00   |
|                      | 500        | 1470,26 ± 6,05 | 530,12 ± 0,00  | 2,77 ± 2,57         | 2000,39 ± 0,00   |
| <i>H. heimii</i>     | 0          | 2274,15 ± 4,03 | 882,75 ± 4,02  | 2,57 ± 1,67         | 3156,91 ± 2,83   |
|                      | 5          | 2176,67 ± 7,04 | 1691,89 ± 2,96 | 1,28 ± 4,05         | 3868,57 ± 6,99   |
|                      | 10         | 2330,68 ± 3,01 | 1857,69 ± 3,15 | 1,25 ± 5,21         | 4188,38 ± 6,11   |
|                      | 50         | 2277,37 ± 0,00 | 1846,64 ± 9,15 | 1,23 ± 1,01         | 4124,01 ± 0,00   |
|                      | 100        | 1151,47 ± 0,00 | 855,97 ± 9,17  | 1,34 ± 6,91         | 2007,45 ± 0,00   |
|                      | 200        | 110,91 ± 0,00  | 196,55 ± 0,00  | 0,56 ± 9,27         | 307,49 ± 0,00    |
|                      | 300        | 1279,84 ± 2,97 | 1075,75 ± 6,05 | 1,18 ± 1,51         | 2355,60 ± 1,57   |
|                      | 500        | 654,04 ± 0,00  | 759,32 ± 0,00  | 0,86 ± 1,16         | 1413,36 ± 0,00   |



**Grafik 10.** Koncentracija ukupnih hlorofila kod ispitivanih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

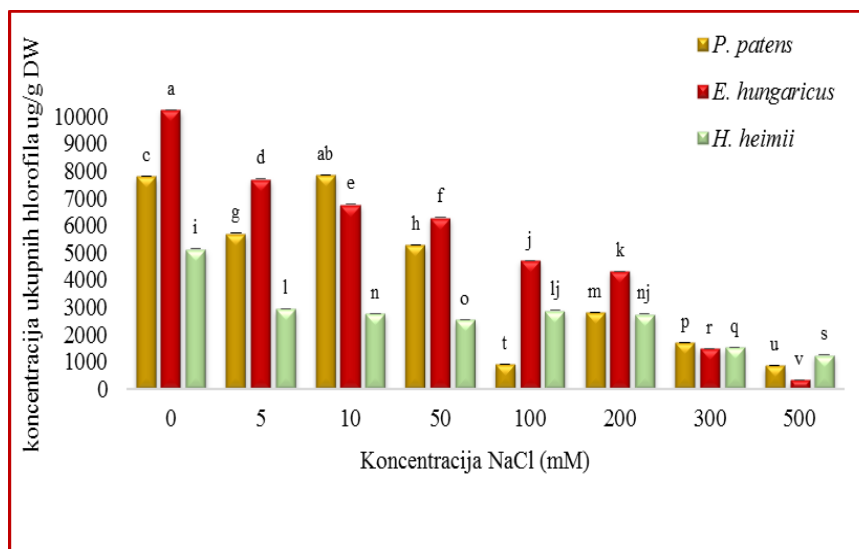
Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da kod kontrolne grupe biljaka i kod biljaka gajenih na niskim koncentracijama soli (5 i 10 mM NaCl) dolazi do porasta koncentracije ukupnih hlorofila pri kratkotrajnom izlaganju solima (grafik 10). Porast vrednosti ukupnih hlorofila kod vrste *P. patens* nastavlja se linearno i na koncentraciji od 50 mM NaCl, gde je zabeležena vrednost od 8154.22 ug/g DW. Kod vrste *E. hungaricus* izlagane tri dana stresu solima uočava se da na koncentracijama većim od 200 mM NaCl dolazi do linearnog pada vrednosti ukupnih hlorofila, što ukazuje da i pri kratkotrajnom izlaganju stresu solima dolazi do inhibicije sinteze fotosintetičkih pigmenata. Kod vrste *H. heimi* zabeležena je najmanja koncentracija ukupnih hlorofila u odnosu na druge dve ispitivane vrste, kao i najveći pad vrednosti pri tretmanu solima od 200 mM NaCl (307.49 ug/g DW). Vrsta *P. patens* ima statistički značajno veću vrednost ukupnih hlorofila u odnosu na druge dve vrste, na koncentracijama 50 i 100 mM NaCl pri kratkotrajnom izlaganju stresu solima.

Vrednosti odnosa hlorofila a i b, kao i koncentracija ukupnih hlorofila su najniže kod vrste *H. heimi* (tabela 13) pri kratkotrajnom izlaganju stresu solima. Kod vrste *E. hungaricus* najveći odnos hla/hlb se uočava kod kontrolne grupe biljaka, dok se porastom koncentracije NaCl taj odnos se smanjuje u odnosu na kontrolu, što ukazuje na prisustvo stresa.

Kod dugotrajnog stresa solima u trajanju od tri nedelje mereni su isti parametri kao i kod kratkotrajnog izlaganje stresu solima. Rezultati merenja su prikazani u tabeli 14.

**Tabela 14.** Koncentracija hlorofila a, hlorofila b, ukupnih hlorofila i odnos hlorofila a/b kod mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* izlaganih tri nedelje stresu solima u kulturi *in vitro*. Koncentracija soli je izražena u mM, a koncentracija hlorofila a, hlorofila b i ukupnih hlorofila u  $\mu\text{g/g}$  DW.

| VRSTA                | konc. soli | hlorofil a         | hlorofil b         | odnos hlorofila a/b | ukupni hlorofili    |
|----------------------|------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| <i>P. patens</i>     | 0          | 6058,73 $\pm$ 7,88 | 1739,26 $\pm$ 7,14 | 3,48 $\pm$ 1,02     | 7798,00 $\pm$ 3,97  |
|                      | 5          | 4108,13 $\pm$ 2,06 | 1603,36 $\pm$ 7,50 | 2,56 $\pm$ 5,44     | 5711,49 $\pm$ 7,11  |
|                      | 10         | 6055,86 $\pm$ 6,10 | 1791,26 $\pm$ 1,98 | 3,38 $\pm$ 5,25     | 7847,13 $\pm$ 4,44  |
|                      | 50         | 4028,33 $\pm$ 3,85 | 1265,69 $\pm$ 1,84 | 3,18 $\pm$ 5,18     | 5294,03 $\pm$ 4,13  |
|                      | 100        | 624,40 $\pm$ 0,00  | 268,33 $\pm$ 0,00  | 2,32 $\pm$ 1,25     | 892,73 $\pm$ 0,00   |
|                      | 200        | 2091,83 $\pm$ 0,00 | 731,06 $\pm$ 4,87  | 2,86 $\pm$ 4,82     | 2822,90 $\pm$ 0,00  |
|                      | 300        | 1201,29 $\pm$ 8,60 | 487,46 $\pm$ 0,00  | 2,46 $\pm$ 5,13     | 1688,76 $\pm$ 0,00  |
|                      | 500        | 614,35 $\pm$ 0,00  | 234,13 $\pm$ 0,00  | 2,62 $\pm$ 1,61     | 848,48 $\pm$ 0,00   |
| <i>E. hungaricus</i> | 0          | 8000,79 $\pm$ 4,02 | 2243,22 $\pm$ 5,96 | 3,56 $\pm$ 7,28     | 10244,02 $\pm$ 2,79 |
|                      | 5          | 5711,23 $\pm$ 1,11 | 1985,43 $\pm$ 7,82 | 2,87 $\pm$ 7,94     | 7696,66 $\pm$ 4,86  |
|                      | 10         | 5112,50 $\pm$ 6,28 | 1656,26 $\pm$ 6,06 | 3,08 $\pm$ 1,04     | 6768,76 $\pm$ 2,43  |
|                      | 50         | 4441,41 $\pm$ 2,77 | 1846,79 $\pm$ 2,21 | 2,40 $\pm$ 5,12     | 6288,21 $\pm$ 0,00  |
|                      | 100        | 3719,91 $\pm$ 1,22 | 1001,70 $\pm$ 0,00 | 3,71 $\pm$ 8,42     | 4721,61 $\pm$ 1,24  |
|                      | 200        | 3220,45 $\pm$ 1,70 | 1104,22 $\pm$ 0,00 | 2,91 $\pm$ 1,90     | 4324,67 $\pm$ 7,56  |
|                      | 300        | 1127,43 $\pm$ 0,00 | 366,86 $\pm$ 0,00  | 3,07 $\pm$ 5,32     | 1494,29 $\pm$ 1,06  |
|                      | 500        | 234,45 $\pm$ 0,00  | 112,98 $\pm$ 0,00  | 2,07 $\pm$ 4,28     | 347,44 $\pm$ 0,00   |
| <i>H. heimii</i>     | 0          | 3671,81 $\pm$ 1,23 | 1465,53 $\pm$ 1,91 | 2,50 $\pm$ 8,67     | 5137,35 $\pm$ 2,78  |
|                      | 5          | 1625,74 $\pm$ 0,00 | 1319,36 $\pm$ 8,73 | 1,23 $\pm$ 8,30     | 2945,11 $\pm$ 0,00  |
|                      | 10         | 1460,49 $\pm$ 2,54 | 1314,68 $\pm$ 0,00 | 1,11 $\pm$ 2,12     | 2775,18 $\pm$ 0,00  |
|                      | 50         | 1371,76 $\pm$ 6,54 | 1167,08 $\pm$ 0,00 | 1,175 $\pm$ 4,52    | 2538,84 $\pm$ 0,00  |
|                      | 100        | 1725,35 $\pm$ 1,93 | 1155,53 $\pm$ 0,00 | 1,49 $\pm$ 1,20     | 2880,89 $\pm$ 0,00  |
|                      | 200        | 1587,42 $\pm$ 3,32 | 1162,02 $\pm$ 0,00 | 1,36 $\pm$ 1,99     | 2749,44 $\pm$ 0,00  |
|                      | 300        | 835,44 $\pm$ 4,40  | 692,50 $\pm$ 8,03  | 1,20 $\pm$ 1,59     | 1527,95 $\pm$ 0,00  |
|                      | 500        | 671,11 $\pm$ 0,00  | 568,88 $\pm$ 0,00  | 1,17 $\pm$ 4,94     | 1240,00 $\pm$ 0,00  |



**Grafik 11.** Koncentracija ukupnih hlorofila kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Kod biljaka izlaganih tri nedelje stresu solima (grafik 11, tabela 14), uočava se da visoke koncentracije soli inhibiraju sintezu glavnih fotosintetičkih pigmenata, tj. hlorofila. Kod vrste *E. hungaricus*, povećanjem koncentracije NaCl, dolazi do linearnog pada vrednosti ukupnih hlorofila od 10244.02 do 347.44 ug/g DW. Sličan trend se uočava i za vrstu *H. heimii*, kao i za vrstu *P. patens*. Visoke koncentracije soli dovode do smanjenja količine fotosintetičkih pigmenata, a samim tim smanjuje se i intenzitet fotosinteze. Smanjenjem intenziteta fotosinteze usporavaju se i druge fiziološke funkcije u samim biljkama, što za posledicu ima i manju produktivnost ovih biljaka. Kao i pri tretmanu stresu solima od tri dana i u ovom eksperimentu vrsta *H. heimii* ima najmanju koncentraciju hlorofila. Najmanji odnos hlorofila a i b se takođe uočava kod vrste *H. heimii* u odnosu na druge dve ispitivane vrste.

#### 4.5.2 Uticaj stresa solima na koncentraciju karotena mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u uslovima *in vitro*

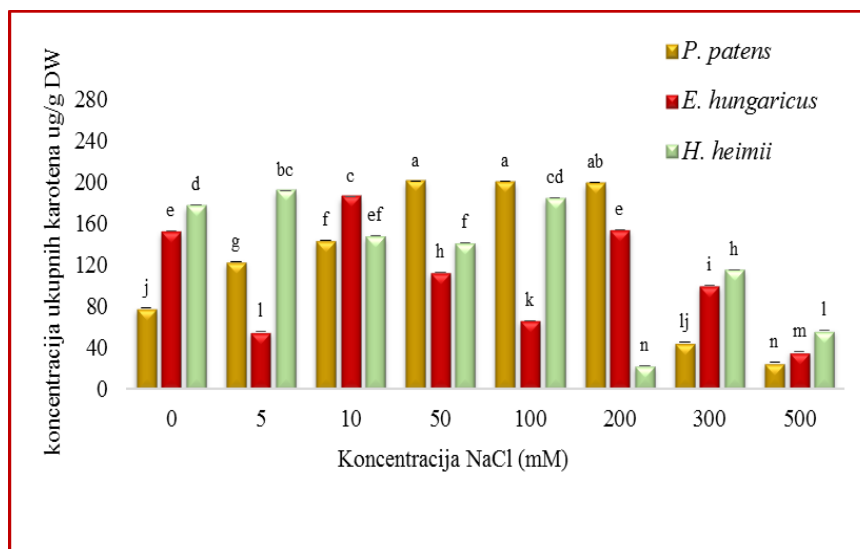
U tabeli 15 je prikazana koncentracija pojedinačnih karotena ( $\alpha$  karoten i  $\beta$  karoten) kao i ukupnih karotena kod biljaka izlaganih tri dana stresu solima. Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da je koncentracija  $\beta$  karotena veća u odnosu na koncentraciju  $\alpha$  karotena u svim uzorcima. Kod vrste *P. patens* nije zabeleženo



prisustvo  $\alpha$  karotena kod kontrolne grupe biljaka i kod biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom NaCl koncentracije 5 mM.

**Tabela 15.** Koncentracija  $\alpha$  karotena,  $\beta$  karotena, ukupnih karotena kod mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* izlaganih tri dana stresu solima u kulturi *in vitro*. Koncentracija soli je izražena u mM, a koncentracija  $\alpha$  karotena,  $\beta$  karotena i ukupnih karotena u  $\mu\text{g/g DW}$ .

| VRSTA                | konc. soli | $\alpha$ karoten | $\beta$ karoten   | ukupno karoteni   |
|----------------------|------------|------------------|-------------------|-------------------|
| <i>P. patens</i>     | 0          | 0,00 $\pm$ 0,00  | 77,92 $\pm$ 0,00  | 77,92 $\pm$ 0,00  |
|                      | 5          | 0,00 $\pm$ 0,00  | 122,45 $\pm$ 0,00 | 122,45 $\pm$ 0,00 |
|                      | 10         | 14,29 $\pm$ 0,03 | 128,82 $\pm$ 0,00 | 143,16 $\pm$ 0,01 |
|                      | 50         | 20,31 $\pm$ 0,00 | 180,55 $\pm$ 0,00 | 200,88 $\pm$ 0,00 |
|                      | 100        | 20,79 $\pm$ 0,02 | 179,19 $\pm$ 0,01 | 200,00 $\pm$ 0,02 |
|                      | 200        | 16,49 $\pm$ 0,00 | 182,28 $\pm$ 0,00 | 198,78 $\pm$ 0,00 |
|                      | 300        | 0,00 $\pm$ 0,00  | 45,12 $\pm$ 0,037 | 45,12 $\pm$ 0,03  |
|                      | 500        | 14,76 $\pm$ 0,00 | 10,45 $\pm$ 0,04  | 25,27 $\pm$ 0,01  |
| <i>E. hungaricus</i> | 0          | 6,15 $\pm$ 0,00  | 145,91 $\pm$ 0,00 | 152,07 $\pm$ 0,01 |
|                      | 5          | 0,00 $\pm$ 0,00  | 55,45 $\pm$ 0,00  | 55,45 $\pm$ 0,00  |
|                      | 10         | 5,12 $\pm$ 0,01  | 180,75 $\pm$ 0,00 | 185,92 $\pm$ 0,00 |
|                      | 50         | 3,73 $\pm$ 0,00  | 108,73 $\pm$ 0,00 | 112,46 $\pm$ 0,00 |
|                      | 100        | 0,00 $\pm$ 0,00  | 66,23 $\pm$ 0,01  | 66,23 $\pm$ 0,01  |
|                      | 200        | 3,96 $\pm$ 0,00  | 149,59 $\pm$ 0,00 | 153,55 $\pm$ 0,00 |
|                      | 300        | 0,00 $\pm$ 0,00  | 99,92 $\pm$ 0,00  | 99,92 $\pm$ 0,00  |
|                      | 500        | 0,00 $\pm$ 0,00  | 36,18 $\pm$ 0,02  | 36,18 $\pm$ 0,02  |
| <i>H. heimii</i>     | 0          | 3,92 $\pm$ 0,00  | 173,17 $\pm$ 0,00 | 177,10 $\pm$ 0,00 |
|                      | 5          | 4,29 $\pm$ 0,01  | 187,46 $\pm$ 0,00 | 191,78 $\pm$ 0,00 |
|                      | 10         | 4,79 $\pm$ 0,03  | 142,63 $\pm$ 0,00 | 147,48 $\pm$ 0,00 |
|                      | 50         | 4,53 $\pm$ 0,02  | 136,76 $\pm$ 0,00 | 141,35 $\pm$ 0,00 |
|                      | 100        | 4,30 $\pm$ 0,03  | 180,19 $\pm$ 0,00 | 184,57 $\pm$ 0,00 |
|                      | 200        | 13,51 $\pm$ 0,01 | 9,26 $\pm$ 0,01   | 22,84 $\pm$ 0,00  |
|                      | 300        | 4,57 $\pm$ 0,01  | 110,71 $\pm$ 0,00 | 115,32 $\pm$ 0,00 |
|                      | 500        | 0,00 $\pm$ 0,00  | 56,78 $\pm$ 0,01  | 56,78 $\pm$ 0,01  |



**Grafik 12.** Koncentracija ukupnih karotena kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

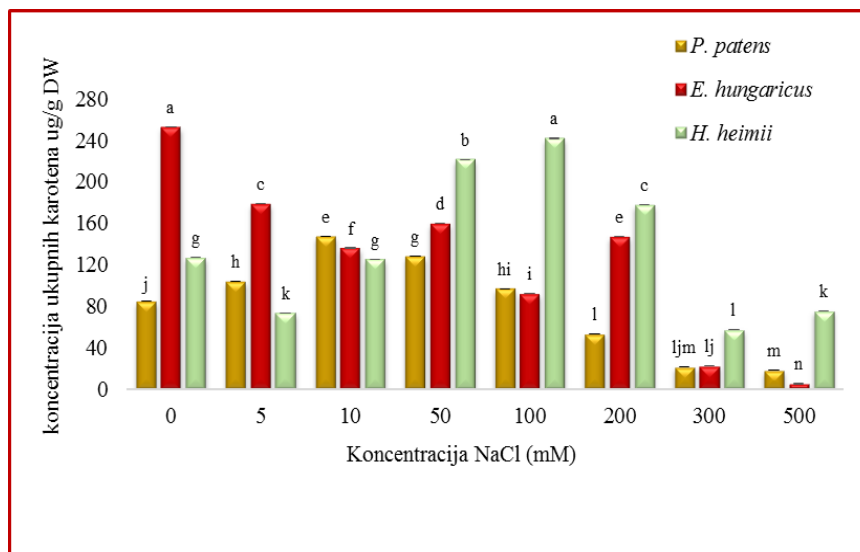
Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 10), uočava se da u kontrolnoj grupi biljaka vrsta *P. patens* ima statistički značajno manju količinu karotena (77.92 ug/g DW) u odnosu na druge dve ispitivane vrste. Kod *P. patens* se može uočiti linearan porast vrednosti ukupnih karotena sa porastom koncentracije NaCl do koncentracije od 50 mM NaCl, gde je zabeležena vrednost od 200.88 ug/g DW. Vrsta *E. hungaricus* dostiže najveću koncentraciju karotena pri tretmanu od 10 mM NaCl (185.92 ug/g DW), a daljim povećanjem koncentracije NaCl u podlozi, količina karotena u biljkama opada. Na najvišim koncentracijama NaCl fakultativne halofite kao što su *E. hungaricus* i *H. heimii* imaju veću vrednost ukupnih karotena u odnosu na *P. patens*.

Kao i kod biljaka koje su izlagane stresu solima tokom tri dana, i kod grupe biljaka koja je izlagana stresu solima veća je koncentracija  $\beta$  karotena, nego  $\alpha$  karotena (tabela 16). Ovaj fenomen je uočen kod sve tri ispitivane vrste. Kod vrste *E. hungaricus*  $\alpha$  karoten je prisutan u biljkama raslim na svim tretmanima soli, osim na najvećim koncentracijama od 300 i 500 mM NaCl. Kod vrste *H. heimii*  $\alpha$  karoten je prisutan i u biljkama raslim na visokim koncentracijama NaCl od 300 mM NaCl.

**Tabela 16.** Koncentracija  $\alpha$  karotena,  $\beta$  karotena, ukupnih karotena kod mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* izlaganih tri nedelje stresu solima u kulturi *in vitro*. Koncentracija soli je izražena u mM, a koncentracija  $\alpha$  karotena,  $\beta$  karotena i ukupnih karotena u  $\mu\text{g/g DW}$ .

| VRSTA                | konc. soli | $\alpha$ karoten | $\beta$ karoten   | ukupno karoteni   |
|----------------------|------------|------------------|-------------------|-------------------|
| <i>P. patens</i>     | 0          | 9,59 $\pm$ 0,00  | 74,78 $\pm$ 0,00  | 84,38 $\pm$ 0,07  |
|                      | 5          | 0,00 $\pm$ 0,00  | 103,95 $\pm$ 0,02 | 103,95 $\pm$ 0,14 |
|                      | 10         | 9,66 $\pm$ 0,00  | 137,72 $\pm$ 0,00 | 147,39 $\pm$ 0,05 |
|                      | 50         | 7,09 $\pm$ 0,00  | 120,56 $\pm$ 0,00 | 127,66 $\pm$ 0,03 |
|                      | 100        | 9,21 $\pm$ 0,00  | 87,65 $\pm$ 0,00  | 96,89 $\pm$ 0,056 |
|                      | 200        | 0,00 $\pm$ 0,00  | 52,93 $\pm$ 0,01  | 52,93 $\pm$ 0,11  |
|                      | 300        | 0,00 $\pm$ 0,00  | 21,37 $\pm$ 0,07  | 21,37 $\pm$ 0,28  |
|                      | 500        | 0,17 $\pm$ 0,17  | 17,78 $\pm$ 0,05  | 18,26 $\pm$ 0,28  |
| <i>E. hungaricus</i> | 0          | 12,63 $\pm$ 0,01 | 239,85 $\pm$ 0,00 | 252,51 $\pm$ 0,10 |
|                      | 5          | 8,98 $\pm$ 0,00  | 169,36 $\pm$ 0,00 | 178,35 $\pm$ 0,06 |
|                      | 10         | 6,34 $\pm$ 0,02  | 129,58 $\pm$ 0,00 | 135,97 $\pm$ 0,11 |
|                      | 50         | 5,12 $\pm$ 0,01  | 154,70 $\pm$ 0,01 | 159,86 $\pm$ 0,13 |
|                      | 100        | 2,58 $\pm$ 0,00  | 89,26 $\pm$ 0,01  | 91,87 $\pm$ 0,11  |
|                      | 200        | 16,67 $\pm$ 0,01 | 130,36 $\pm$ 0,00 | 147,06 $\pm$ 0,02 |
|                      | 300        | 0,00 $\pm$ 0,00  | 22,09 $\pm$ 0,01  | 22,09 $\pm$ 0,13  |
|                      | 500        | 0,00 $\pm$ 0,00  | 5,09 $\pm$ 0,01   | 5,09 $\pm$ 0,13   |
| <i>H. heimii</i>     | 0          | 7,00 $\pm$ 0,00  | 119,97 $\pm$ 0,00 | 126,98 $\pm$ 0,06 |
|                      | 5          | 0,00 $\pm$ 0,00  | 73,53 $\pm$ 0,00  | 73,53 $\pm$ 0,05  |
|                      | 10         | 0,00 $\pm$ 0,00  | 125,31 $\pm$ 0,01 | 125,31 $\pm$ 0,1  |
|                      | 50         | 0,00 $\pm$ 0,00  | 221,46 $\pm$ 0,00 | 221,46 $\pm$ 0,06 |
|                      | 100        | 4,09 $\pm$ 0,00  | 237,58 $\pm$ 0,00 | 241,68 $\pm$ 0,06 |
|                      | 200        | 4,56 $\pm$ 0,00  | 173,18 $\pm$ 0,01 | 177,76 $\pm$ 0,13 |
|                      | 300        | 0,00 $\pm$ 0,00  | 57,57 $\pm$ 0,01  | 57,57 $\pm$ 0,12  |
|                      | 500        | 0,96 $\pm$ 0,00  | 74,49 $\pm$ 0,01  | 75,46 $\pm$ 0,10  |





**Grafik 13.** Koncentracija ukupnih karotena kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 13) uočava se obrnut trend promene ukupne koncentracije karotena kod vrsta *H. heimii* i *E. hungaricus*. Kod vrste *E. hungaricus* sa povećanjem koncentracije NaCl u podlozi dolazi do smanjenja vrednosti ukupnih karotena, dok kod vrste *H. heimii* povećanjem koncentracije NaCl do 100 mM količina karotena u biljkama raste, dok dalje povećanje koncentracije soli dovodi do opadanja koncentracije ukupnih karotena. Vrednost ukupnih karotena pri dugotrajnom izlaganju stresu solima kod vrste *P. patens* raste na niskim koncentracijama soli do 10 mM NaCl gde je zabeležena vrednost od 147.39 ug/g DW, a daljim povećavanjem koncentracije soli dolazi do linearnog opadanja vrednosti karotena u biljkama. Visoke koncentracije soli koje su primenjene (200 i 300 mM NaCl), uslovljavaju veću vrednost ukupnih karotena kod fakultativnih halofita, u odnosu na *P. patens*.

#### 4.5.3. Uticaj stresa solima na koncentraciju ksantofila kod mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u uslovima *in vitro*

Proučavan je uticaj stresa solima na sadržaj ksantofila, kao pomoćnih fotosintetičkih pigmenata. Analiziran je sadržaj više tipova ksantofila, kao što su neoksanthin, lutein, violaksantin, anteraksantin i zeaksantin. Merenje sadržaja različitih ksantofila je značajno u objašnjavanju fiziološkog stanja biljne vrste, pre svega, jer

pojedine grupe ksantofila kao što su anteraksantin, violaksantin i zeaksantin imaju veliki značaj u ksantofilnom ciklusu.

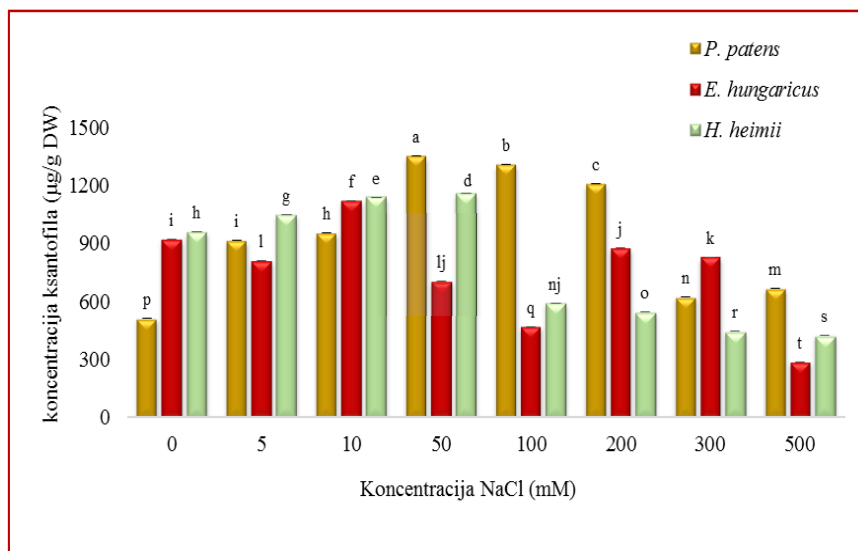
Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 17) može se uočiti da su kod sve tri ispitivane vrste neoksantin i lutein dominantni tipovi ksantofila. Ono što je interesantno jeste da prilikom izlaganja stresu solima u trajanju tri dana biljke *H. heimii* ne sintetišu zeaksantin ni na jednoj koncentraciji primenjenog NaCl, a sličan trend zabeležen je i kod vrste *E. hungaricus* gde na pojedinim tretmanima sa NaCl ne dolazi do stvaranja zeaksantina.

**Tabela 17.** Koncentracija ukupnih i pojedinačnih ksantofila kod mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* izlaganih tri dana stresu solima u kulturi *in vitro*. Koncentracija soli je izražena u mM, a koncentracija neoksantina, luteina, violaksantina, anteraksantina i zeaksantina u  $\mu\text{g/g DW}$ .

| VRSTA                | kone.<br>soli | neoksantin    | lutein        | violaksantin  | anteraksantin | zeaksantin    | ukupni<br>ksantofili |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------------|
| <i>P. patens</i>     | 0             | 122,62 ± 0,00 | 311,48 ± 0,02 | 40,13 ± 0,00  | 10,43 ± 0,01  | 29,29 ± 0,00  | 514,03 ± 0,01        |
|                      | 5             | 224,94 ± 0,00 | 487,46 ± 0,00 | 55,03 ± 0,00  | 31,38 ± 0,00  | 116,06 ± 0,00 | 914,91 ± 0,00        |
|                      | 10            | 265,55 ± 0,00 | 519,79 ± 0,00 | 73,01 ± 0,00  | 36,16 ± 0,00  | 59,26 ± 0,00  | 953,83 ± 0,00        |
|                      | 50            | 372,89 ± 0,00 | 715,69 ± 0,00 | 152,89 ± 0,00 | 54,09 ± 0,00  | 55,49 ± 0,00  | 1351,09 ± 0,00       |
|                      | 100           | 362,09 ± 0,00 | 685,48 ± 0,02 | 100,65 ± 0,00 | 52,82 ± 0,00  | 107,62 ± 0,00 | 1308,74 ± 0,00       |
|                      | 200           | 326,76 ± 0,00 | 583,08 ± 0,05 | 92,92 ± 0,00  | 49,99 ± 0,00  | 154,87 ± 0,01 | 1207,68 ± 0,05       |
|                      | 300           | 150,26 ± 0,00 | 353,85 ± 0,00 | 33,24 ± 0,01  | 23,58 ± 0,00  | 62,81 ± 0,00  | 623,80 ± 0,01        |
|                      | 500           | 163,65 ± 0,00 | 382,06 ± 0,00 | 25,89 ± 0,07  | 17,95 ± 0,00  | 76,36 ± 0,01  | 666,12 ± 0,00        |
| <i>E. hungaricus</i> | 0             | 199,06 ± 0,00 | 586,03 ± 0,00 | 109,89 ± 0,00 | 25,92 ± 0,02  | 0,00 ± 0,00   | 920,95 ± 0,00        |
|                      | 5             | 206,65 ± 0,00 | 473,09 ± 0,00 | 82,96 ± 0,00  | 16,18 ± 0,00  | 31,95 ± 0,00  | 810,89 ± 0,00        |
|                      | 10            | 292,52 ± 0,00 | 640,83 ± 0,00 | 159,76 ± 0,00 | 26,45 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00   | 1119,59 ± 0,00       |
|                      | 50            | 179,16 ± 0,00 | 397,49 ± 0,00 | 114,12 ± 0,00 | 14,12 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00   | 704,93 ± 0,00        |
|                      | 100           | 103,12 ± 0,00 | 275,31 ± 0,00 | 24,65 ± 0,02  | 14,85 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00   | 470,27 ± 0,01        |
|                      | 200           | 197,56 ± 0,00 | 479,79 ± 0,00 | 144,50 ± 0,01 | 12,01 ± 0,02  | 52,24 ± 0,00  | 876,79 ± 0,00        |
|                      | 300           | 209,86 ± 0,00 | 483,39 ± 0,00 | 71,51 ± 0,01  | 22,41 ± 0,00  | 42,80 ± 0,01  | 830,05 ± 0,00        |
|                      | 500           | 71,95 ± 0,00  | 165,29 ± 0,00 | 32,70 ± 0,01  | 9,62 ± 0,020  | 9,56 ± 0,01   | 289,26 ± 0,00        |
| <i>H. heimii</i>     | 0             | 201,02 ± 0,00 | 706,63 ± 0,00 | 24,61 ± 0,10  | 25,40 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00   | 957,90 ± 0,00        |
|                      | 5             | 183,33 ± 0,00 | 639,77 ± 0,00 | 196,05 ± 0,00 | 28,48 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00   | 1047,66 ± 0,00       |
|                      | 10            | 206,86 ± 0,00 | 685,36 ± 0,00 | 213,91 ± 0,00 | 33,06 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00   | 1139,23 ± 0,00       |
|                      | 50            | 214,25 ± 0,00 | 694,52 ± 0,00 | 216,87 ± 0,00 | 34,54 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00   | 1160,21 ± 0,00       |
|                      | 100           | 99,86 ± 0,00  | 369,14 ± 0,00 | 102,32 ± 0,00 | 21,55 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00   | 592,90 ± 0,00        |
|                      | 200           | 87,55 ± 0,00  | 345,99 ± 0,00 | 101,23 ± 0,00 | 11,04 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00   | 545,85 ± 0,00        |
|                      | 300           | 77,31 ± 0,01  | 268,23 ± 0,00 | 82,83 ± 0,00  | 17,71 ± 0,03  | 0,00 ± 0,00   | 446,16 ± 0,01        |
|                      | 500           | 71,23 ± 0,05  | 289,67 ± 0,00 | 52,45 ± 0,01  | 11,38 ± 0,04  | 0,00 ± 0,00   | 424,93 ± 0,02        |

Kod vrste *P. patens* zabeležene su statistički značajno najviše koncentracije zeaksantina, koje su na svim tretmanima NaCl bile više u odnosu na koncentracije kod kontrolne grupe biljaka. Kod ove ispitivane vrste koncentracija zeaksantina je bila veća za sve primenjene koncentracije NaCl u odnosu na koncentraciju anteraksantina, dok je kod druge dve ispitivane vrste situacija potpuno drugačija u korist anteraksantina. Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 18) uočava se da je među ispitivanim ksantofilima lutein kod sve tri vrste dominantan tip ksantofila.

Sadržaj violaksantina kod vrste *P. patens* linearno raste u odnosu na kontrolnu grupu biljaka povećanjem koncentracije soli od 0 do 50 mM NaCl, gde je zabeležena vrednost od 152.89 ug/g DW, a daljim povećavanjem koncentracije soli dolazi do linearnog pada vrednosti violaksantina i pri tretmanu soli od 500 mM NaCl iznosi 25.89 ug/g DW. Isti trend porasta violaksantina do 50 mM NaCl ima i vrsta *H. heimii* sa zabeleženom vrednošću od 216,87 ug/g DW, a na višim koncentracijama od 50 mM NaCl dolazi do linearnog pada vrednosti violaksantina i ona iznosi 52.45 ug/g DW. Kod vrste *E. hungaricus* najveća zabeležena vrednost violaksantina jeste pri tretmanu od 10 mM NaCl i iznosi 159,76 ug/g DW.



**Grafik 14.** Koncentracija ukupnih ksantofila kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 14) možemo uočiti trend rasta ukupnih ksantofila kod biljaka izlaganih tri dana stresu solima na koncentracijama do 50 mM NaCl. Pri tretmanima od 100 i 200 mM NaCl vrsta *P. patens* ima statistički značajno veću količinu ukupnih ksantofila u odnosu na druge dve ispitivane vrste. Kod vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* na kocentraciji od 100 mM NaCl zabeležen je nagli pad vrednosti ukupnih ksantofila , a zatim na 200 i 300 mM NaCl, vrednost ukupnih ksantofila postepeno raste.

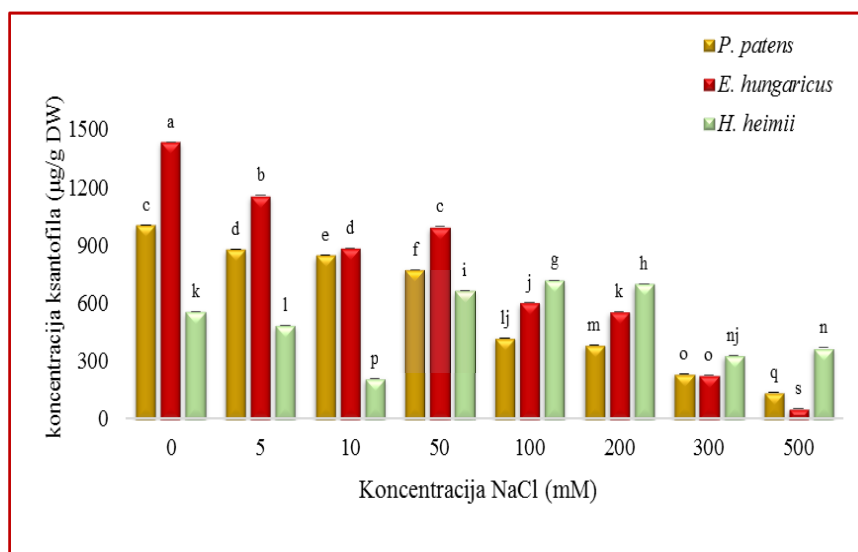
**Tabela 18.** Koncentracija ukupnih i pojedinačnih ksantofila kod mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* izlaganih tri nedelje stresu solima u kulturi *in vitro*. Koncentracija soli je izražena u mM, a koncentracija neoksantina, luteina, violaksantina, anteraksantina i zeaksantina u  $\mu\text{g/g DW}$ .

| VRSTA                | konc. soli | neoksantin    | lutein        | violaksantin  | anteraksantin | zeaksantin   | ukupni ksantofili |
|----------------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|-------------------|
| <i>P. patens</i>     | 0          | 249,23 ± 0,00 | 574,49 ± 0,00 | 147,79 ± 0,00 | 18,25 ± 0,00  | 14,29 ± 0,00 | 1004,09 ± 0,00    |
|                      | 5          | 296,63 ± 0,00 | 484,46 ± 0,00 | 82,05 ± 0,00  | 16,63 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 879,79 ± 0,00     |
|                      | 10         | 194,15 ± 0,00 | 518,09 ± 0,00 | 115,39 ± 0,00 | 18,16 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 845,82 ± 0,00     |
|                      | 50         | 201,29 ± 0,00 | 418,26 ± 0,00 | 132,98 ± 0,00 | 20,59 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 773,15 ± 0,00     |
|                      | 100        | 122,89 ± ,00  | 271,59 ± 0,00 | 11,22 ± 0,07  | 14,69 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 420,56 ± 0,00     |
|                      | 200        | 75,12 ± 0,022 | 263,16 ± 0,00 | 32,24 ± 0,01  | 13,63 ± ,00   | 0,00 ± 0,00  | 384,22 ± 0,00     |
|                      | 300        | 43,92 ± 0,03  | 140,86 ± 0,00 | 7,62 ± 0,00   | 5,45 ± 0,00   | 37,84 ± 0,01 | 235,80 ± 0,01     |
|                      | 500        | 24,21 ± 0,04  | 90,87 ± 0,010 | 4,65 ± 0,00   | 4,35 ± 0,00   | 14,92 ± 0,00 | 139,15 ± 0,00     |
| <i>E. hungaricus</i> | 0          | 409,93 ± ,00  | 773,06 ± 0,00 | 220,95 ± 0,00 | 31,92 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 1435,89 ± 0,00    |
|                      | 5          | 302,86 ± 0,00 | 647,16 ± 0,00 | 179,32 ± 0,00 | 27,00 ± 0,01  | 0,00 ± 0,00  | 1156,39 ± 0,00    |
|                      | 10         | 225,11 ± 0,01 | 519,16 ± 0,00 | 121,65 ± 0,03 | 19,26 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 885,26 ± 0,01     |
|                      | 50         | 247,02 ± 0,00 | 600,33 ± 0,00 | 128,15 ± 0,02 | 19,49 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 995,06 ± 0,00     |
|                      | 100        | 154,66 ± 0,00 | 344,19 ± 0,00 | 86,08 ± 0,00  | 15,95 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 600,91 ± 0,00     |
|                      | 200        | 147,66 ± 0,00 | 254,18 ± 0,00 | 103,48 ± 0,00 | 49,04 ± 0,01  | 0,00 ± 0,00  | 554,41 ± 0,00     |
|                      | 300        | 50,26 ± 0,00  | 55,90 ± 0,04  | 31,16 ± 0,03  | 11,69 ± 0,00  | 79,53 ± 0,01 | 228,73 ± 0,01     |
|                      | 500        | 4,62 ± 0,07   | 32,52 ± 0,05  | 2,81 ± 0,02   | 3,42 ± 0,039  | 9,93 ± 0,03  | 53,52 ± 0,12      |
| <i>H. heimii</i>     | 0          | 89,80 ± 0,00  | 408,17 ± 0,00 | 43,70 ± 0,00  | 12,26 ± 0,01  | 0,00 ± 0,00  | 553,98 ± 0,01     |
|                      | 5          | 84,23 ± 0,00  | 337,94 ± 0,00 | 49,55 ± 0,00  | 12,47 ± 0,05  | 0,00 ± 0,00  | 484,34 ± 0,00     |
|                      | 10         | 92,25 ± 0,00  | 40,08 ± 0,00  | 62,26 ± 0,00  | 16,33 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 210,95 ± 0,01     |
|                      | 50         | 109,74 ± 0,00 | 450,88 ± 0,01 | 84,11 ± 0,01  | 17,46 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 662,23 ± 0,02     |
|                      | 100        | 122,42 ± 0,00 | 487,98 ± 0,00 | 86,19 ± 0,01  | 23,22 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 719,87 ± 0,01     |
|                      | 200        | 119,05 ± 0,00 | 459,29 ± 0,01 | 94,27 ± 0,03  | 24,34 ± 0,01  | 0,00 ± 0,00  | 697,09 ± 0,00     |
|                      | 300        | 55,45 ± ,014  | 231,32 ± 0,00 | 32,87 ± 0,01  | 9,80 ± 0,00   | 0,00 ± 0,00  | 329,50 ± 0,01     |
|                      | 500        | 51,75 ± 0,00  | 210,23 ± 0,00 | 33,76 ± 0,02  | 13,84 ± 0,00  | 57,61 ± 0,11 | 367,44 ± 0,04     |



Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 18), uočava se da kod biljaka koje su rasle tri nedelje na hranljivom medijumu sa dodatkom NaCl, količina luteina je najviša u poređenju sa ostalim detektovanim ksantofilima. Prisustvo zeaksantina kod vrsta *E. hungaricus*, *H. heimi* i *P. patens* uočeno je samo na najvišim koncentracijama soli od 300 i 500 mM NaCl, a kod vrste *P. patens* zeaksantin je detektovan i u kontrolnoj grupi biljaka. Interesantna je činjenica da prilikom dugotrajnog stresa kod vrste *P. patens* zeaksantin nije detektovan na koncentracijama soli od 5 do 200 mM NaCl, dok je situacija drugačija u slučaju kratkotrajnog stresa solima.

Količina anteraksantina se statistički značajno razlikuje kod vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*. Kod vrste *E. hungaricus* vrednost anteraksantina opada porastom koncentracije soli, dok kod vrste *H. heimii* vrednost anteraksantina raste sa porastom koncentracije soli, pri dugotrajnom stresu. Kod vrste *P. patens* koncentracija anteraksantina na najvišim koncentracijama NaCl ima statistički značajno nižu vrednost (4.35 ug/g DW) u odnosu na kontrolnu grupu biljaka (18.25 ug/g DW). Isti trend je zabeležen i za vrstu *E. hungaricus*.



**Grafik 15.** Koncentracija ukupnih ksantofila kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

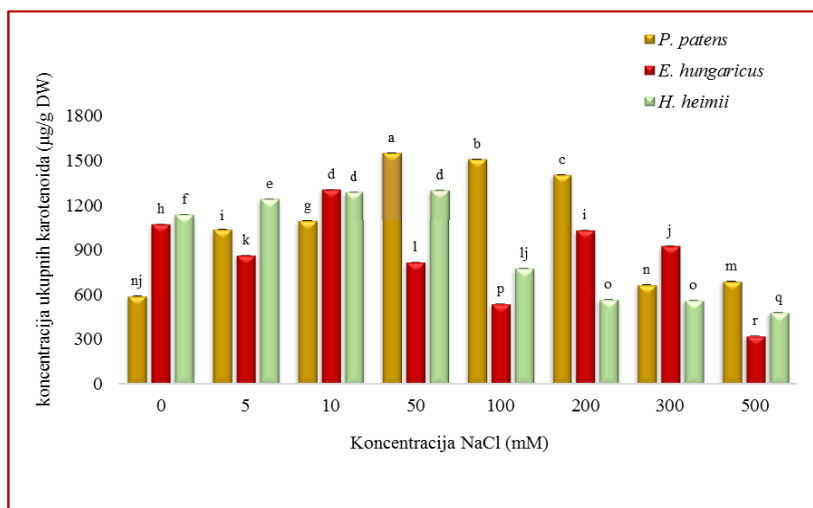
Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 15) uočava se linearan pad vrednosti ukupnih ksantofila kod vrsta *E. hungaricus* i *P. patens*. Na koncentracijama soli od 0 do 50 mM NaCl vrsta *E. hungaricus* ima veću količinu ukupnih ksantofila u odnosu na

druge dve ispitivane vrste. Kod vrste *H. heimii* može se uočiti da na niskim koncentracijama soli od 5 i 10 mM NaCl dolazi do opadanja koncentracije ukupnih ksantofila u odnosu na kontrolnu grupu biljaka, a da u opsegu koncentracija soli od 50 do 200 mM NaCl, dolazi do statistički značajnog povećanja koncentracije ukupnih kantofila.

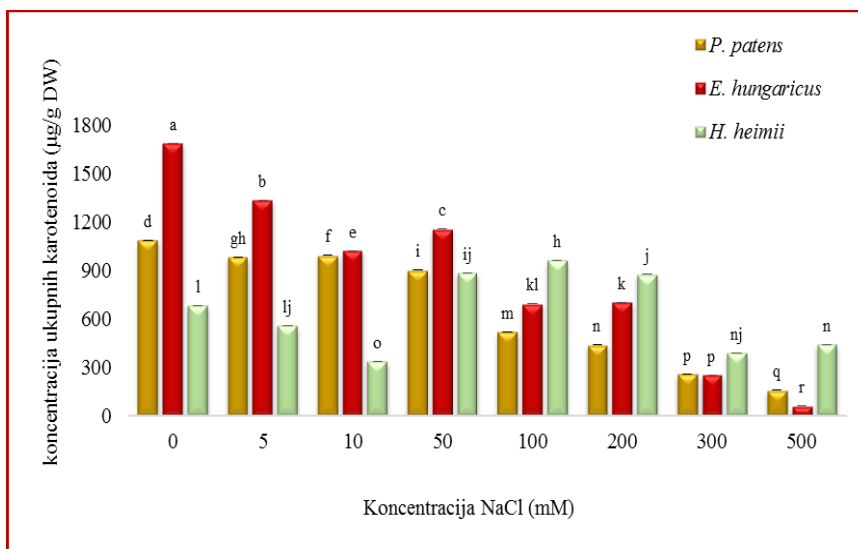
Ako se uporede najviše primenjene koncentracije soli od 300 i 500 mM NaCl može se uočiti da je značajno niža koncentracija ukupnih ksantofila kod biljaka koje su rasle u uslovima dugotrajnog stresa solima, nego kod biljaka koje su rasle tri dana na istim podlogama.

#### 4.5.4. Uticaj stresa solima na količinu ukupnih karotenoida u mahovinama *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u uslovima *in vitro*

Količina ukupnih karotenoida predstavlja zbir vrednosti ukupnih karotena i ukupnih ksantofila. Vrednost ukupnih karotenoida predstavlja jedan od bitnih pokazatelja prisustva i intenziteta određenog stresa kojim su biljke izložene, jer su karotenoidi pomoćni fotosintetički pigmenti i često imaju protektivnu ulogu u biljnom sistemu.



**Grafik 16.** Koncentracija ukupnih karotenoida kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).



**Grafik 17.** Koncentracija ukupnih karotenoida kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Kada se uporedi koncentracija ukupnih karotenoida kod biljaka gajenih tri dana i biljaka gajenih tri nedelje na hranljivom medijumu sa dodatkom NaCl, uočava se različit trend porasta odnosno smanjenja koncentracije ukupnih karotenoida. Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 16 i 17) sadržaj ukupnih karotenoida raste na niskim koncentracijama soli kod biljaka koje su izložene kratkotrajnom stresu. Kod biljaka izloženih tri nedelje stresu solima dolazi do linearnog opadanja vrednosti koncentracije ukupnih karotenoida kod vrsta *P. patens* i *E. hungaricus*, dok vrsta *H. heimii* pokazuje isti trend kao i za vrednosti ukupnih ksantofila.

#### 4.6. Uticaj stresa solima na koncentraciju tokoferola u mahovinama *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u uslovima *in vitro*

Tokoferol predstavlja značajan antioksidans u biljnim sistemima. Praćen je uticaj kratkotrajnog i dugotrajnog izlaganja solima na količinu  $\alpha$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  tokoferola, kao i na količinu ukupnog tokoferola (tabela 19).

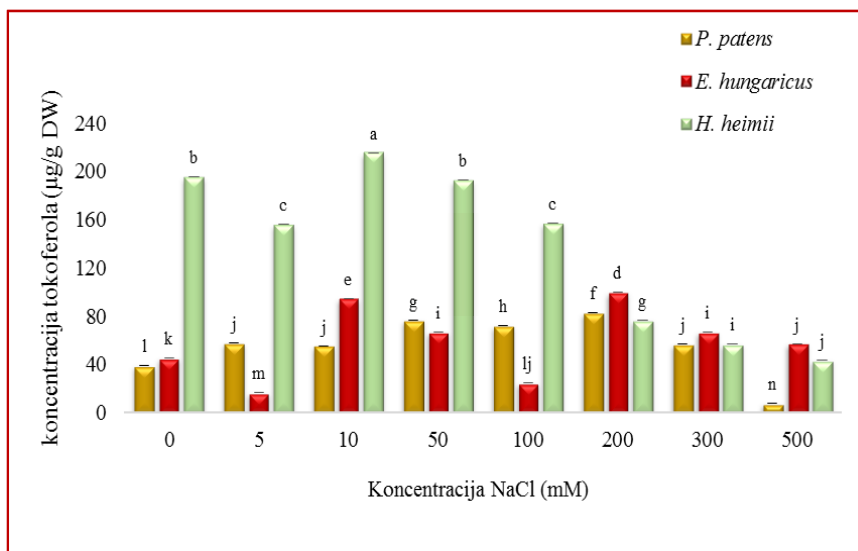
**Tabela 19.** Koncentracija ukupnog tokoferola i  $\alpha, \gamma, \delta$  tokoferola kod mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* izlaganih tri dana stresu solima u kulturi *in vitro*. Koncentracija soli je izražena u mM, a koncentracija ukupnog tokoferola i  $\alpha, \gamma, \delta$  tokoferola u  $\mu\text{g/g DW}$ .

| VRSTA                | konc. soli | $\alpha$ tokoferol | $\gamma$ tokoferol | $\delta$ tokoferol | ukupni tokoferol  |
|----------------------|------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| <i>P. patens</i>     | 0          | 36,17 $\pm$ 0,00   | 2,91 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 39,10 $\pm$ 0,00  |
|                      | 5          | 57,32 $\pm$ 0,00   | 0,52 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 57,86 $\pm$ 0,001 |
|                      | 10         | 55,15 $\pm$ 0,00   | 0,34 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 55,52 $\pm$ 0,00  |
|                      | 50         | 76,33 $\pm$ 0,00   | 0,58 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 76,92 $\pm$ 0,00  |
|                      | 100        | 71,15 $\pm$ 0,00   | 0,91 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 72,07 $\pm$ 0,00  |
|                      | 200        | 82,50 $\pm$ 0,00   | 0,50 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 83,00 $\pm$ 0,00  |
|                      | 300        | 56,31 $\pm$ 0,00   | 0,43 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 56,75 $\pm$ 0,00  |
|                      | 500        | 7,53 $\pm$ 0,01    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 7,53 $\pm$ 0,01   |
| <i>E. hungaricus</i> | 0          | 45,46 $\pm$ 0,00   | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 45,46 $\pm$ 0,00  |
|                      | 5          | 16,44 $\pm$ 0,01   | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 16,44 $\pm$ 0,01  |
|                      | 10         | 93,14 $\pm$ 0,00   | 1,70 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 94,85 $\pm$ 0,00  |
|                      | 50         | 66,00 $\pm$ 0,00   | 0,99 $\pm$ 8,33    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 67,00 $\pm$ 0,00  |
|                      | 100        | 21,81 $\pm$ 0,00   | 2,97 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 24,79 $\pm$ 0,00  |
|                      | 200        | 97,94 $\pm$ 0,00   | 1,80 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 99,75 $\pm$ 0,00  |
|                      | 300        | 64,23 $\pm$ 0,00   | 2,71 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 66,94 $\pm$ 0,00  |
|                      | 500        | 55,02 $\pm$ 0,00   | 2,32 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 57,36 $\pm$ 0,00  |
| <i>H. heimii</i>     | 0          | 193,36 $\pm$ 0,00  | 2,21 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 195,59 $\pm$ 0,00 |
|                      | 5          | 154,86 $\pm$ 0,00  | 1,09 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 155,95 $\pm$ 0,00 |
|                      | 10         | 215,55 $\pm$ 0,00  | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 215,55 $\pm$ 0,00 |
|                      | 50         | 192,66 $\pm$ 0,00  | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 192,66 $\pm$ 0,00 |
|                      | 100        | 152,58 $\pm$ 0,00  | 4,60 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 157,18 $\pm$ 0,00 |
|                      | 200        | 76,76 $\pm$ 0,00   | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 76,76 $\pm$ 0,00  |
|                      | 300        | 55,65 $\pm$ 0,00   | 1,41 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 57,07 $\pm$ 0,00  |
|                      | 500        | 43,56 $\pm$ 0,00   | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 43,56 $\pm$ 0,00  |



Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 19) uočava se da nije detektovano prisustvo  $\delta$  tokoferola ni kod jedne od ispitivanih vrsta koje su bile izložene stresu solima u trajanju od tri dana. Najveće vrednosti su zabeležene za  $\alpha$  tokoferol. Sadržaj  $\alpha$  tokoferola je najviši kod vrste *H. heimii* i dostiže vrednost od 215,55 ug/g DW pri tretmanu gde je dodata koncentracija od 10 mM NaCl, dok su znatno niže vrednosti zabeležene kod vrste *P. patens* i *E. hungaricus*.

Kod vrste *P. patens* koncentracija  $\alpha$  tokoferola raste sa porastom koncentracije NaCl do od 200 mM NaCl (82.50 ug/g DW), dok dalji porast koncentracije soli dovodi do statistički značajnog opadanja sadržaja ovog tipa tokoferola. Kod vrste *H. heimii* vrednost  $\alpha$  tokoferola ima visoke vrednosti na nižim koncentracijama soli, dok na visokim koncentracijama NaCl, kao i kod *P. patens* dolazi do statistički značajnog opadanja sadržaja. Na osnovu tabele 19 može se uočiti da sadržaj  $\gamma$  tokoferola kod sve tri ispitivane vrste značajno niži u odnosu na sadržaj  $\alpha$  tokoferola. Kod vrste *P. patens* najviša koncentracija  $\gamma$  tokoferola je zabeležena kod kontrolne grupe biljaka (2.91 ug/g DW), dok na tretmanima sa NaCl opada. Za vrstu *E. hungaricus* je karakteristično da na tretmanu 5 mM NaCl biljke proizvode samo  $\alpha$  tokoferol.



**Grafik 18.** Koncentracija ukupnog tokoferola kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 18) može se uočiti da je najviša koncentracija ukupnog tokoferola prisutna kod vrste *H. heimii* koja je izlagana stresu solima tokom tri dana. Koncentracija ukupnog tokoferola kod ove vrste je najviša pri tretmanu sa 10 mM NaCl (215.55 ug/g DW), dok na višim koncentracijama dolazi do opadanja vrednosti. Sličan trend se može uočiti i kod *E. hungaricus*, iako se kod ove vrste pri tretmanu od 200 mM NaCl produkuje najviša koncentracija ukupnih tokoferola. Kod vrste *E. hungaricus* nije uočena načajna pravilnost u distribuciji količine tokoferola u odnosu na primenjenu koncentraciju NaCl kod biljaka izlaganih tri dana stresu solima.

Kod dugotrajnog stresa, prisustvo  $\delta$  tokoferola nije detektovano ni kod jedne ispitivane vrste (tabela 20), dok je koncentracija  $\alpha$  tokoferola značajno veća u odnosu na koncentraciju  $\gamma$  tokoferola.

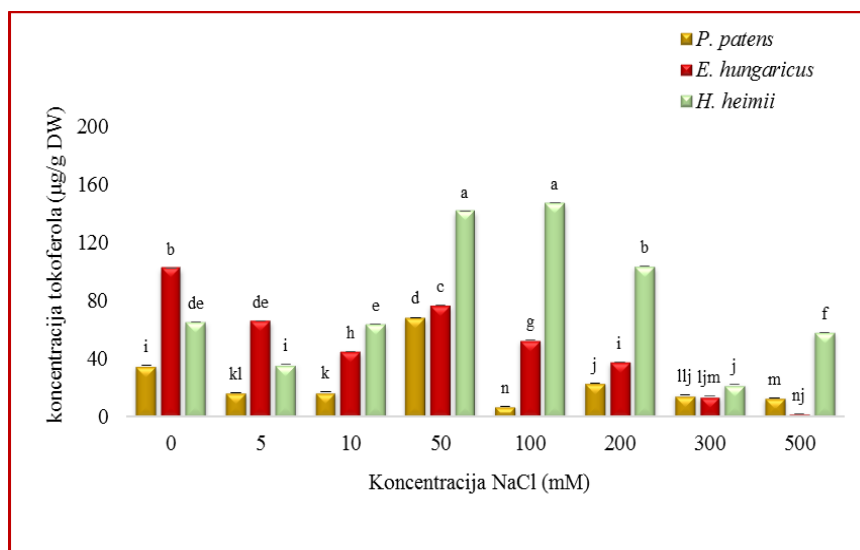
**Tabela 20.** Koncentracija  $\alpha, \gamma, \delta$  i ukupnog tokoferola kod mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* izlaganih tri nedelje stresu solima u kulturi *in vitro*. Koncentracija soli je izražena u mM, a koncentracija ukupnog tokoferola i  $\alpha, \gamma, \delta$  tokoferola u  $\mu\text{g/g DW}$ .

| VRSTA                | konc. soli | $\alpha$ tokoferol | $\gamma$ tokoferol | $\delta$ tokoferol | ukupni tokoferol  |
|----------------------|------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| <i>P. patens</i>     | 0          | 33,12 $\pm$ 0,00   | 2,12 $\pm$ 0,01    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 35,27 $\pm$ 0,00  |
|                      | 5          | 15,80 $\pm$ 0,00   | 0,54 $\pm$ 0,14    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 16,62 $\pm$ 0,01  |
|                      | 10         | 17,17 $\pm$ 0,00   | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 17,17 $\pm$ 0,00  |
|                      | 50         | 68,39 $\pm$ 0,00   | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 68,39 $\pm$ 0,00  |
|                      | 100        | 5,84 $\pm$ 0,024   | 1,32 $\pm$ 0,01    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 7,19 $\pm$ 0,02   |
|                      | 200        | 23,31 $\pm$ 0,01   | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 23,31 $\pm$ 0,01  |
|                      | 300        | 14,61 $\pm$ 0,02   | 0,49 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 15,11 $\pm$ 0,02  |
|                      | 500        | 12,73 $\pm$ 0,00   | 0,24 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 12,98 $\pm$ 0,00  |
| <i>E. hungaricus</i> | 0          | 95,96 $\pm$ 0,00   | 6,48 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 102,45 $\pm$ 0,00 |
|                      | 5          | 62,11 $\pm$ 0,00   | 3,93 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 66,04 $\pm$ 0,00  |
|                      | 10         | 42,76 $\pm$ 0,01   | 2,25 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 45,03 $\pm$ 0,01  |
|                      | 50         | 72,96 $\pm$ 0,00   | 3,85 $\pm$ 0,02    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 76,86 $\pm$ 0,00  |
|                      | 100        | 51,81 $\pm$ 0,01   | 0,67 $\pm$ 0,04    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 52,56 $\pm$ 0,01  |
|                      | 200        | 37,75 $\pm$ 0,00   | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 37,75 $\pm$ 0,00  |
|                      | 300        | 10,14 $\pm$ 0,00   | 3,97 $\pm$ 5,12    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 14,12 $\pm$ 6,63  |
|                      | 500        | 2,08 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 2,08 $\pm$ 0,00   |
| <i>H. heimii</i>     | 0          | 64,80 $\pm$ 0,00   | 0,58 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 65,39 $\pm$ 0,00  |
|                      | 5          | 35,91 $\pm$ 0,00   | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 35,91 $\pm$ 0,00  |
|                      | 10         | 61,95 $\pm$ 6,02   | 1,87 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 63,83 $\pm$ 7,92  |
|                      | 50         | 138,05 $\pm$ 0,00  | 3,61 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 141,67 $\pm$ 0,00 |
|                      | 100        | 143,42 $\pm$ 0,00  | 3,72 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 147,15 $\pm$ 0,00 |
|                      | 200        | 101,02 $\pm$ 0,00  | 2,55 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 103,58 $\pm$ 0,00 |
|                      | 300        | 21,17 $\pm$ 0,00   | 0,97 $\pm$ 0,00    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 22,14 $\pm$ 0,00  |
|                      | 500        | 55,97 $\pm$ 0,00   | 2,02 $\pm$ 6,69    | 0,00 $\pm$ 0,00    | 57,99 $\pm$ 0,00  |

Za sve tri ispitivane vrte na osnovu tabele 20, uočava se da na najvišim koncentracijama NaCl dolazi do značajnog opadanja koncentracije  $\alpha$  tokoferola. Najviša koncentracija  $\alpha$  tokoferola zabeležena je kod vrste *H. heimii*, dok su najniže vrednosti zabeležene kod vrste *P. patens*. Kod vrste *E. hungaricus* u kontroli se uočava da je najviša koncentracija  $\alpha$  tokoferola u poređenju sa biljkama izlaganim stresu solima.

U uslovima kratkotrajnog stresa solima, biljke proizvode veću količinu  $\alpha$  tokoferola na umerenim i visokim koncentracijama soli u poređenju sa biljkama izloženim dugotrajnom stresu. Sličan trend se zapaža i kod vrste *H. heimii*, gde je

koncentracija  $\alpha$  tokoferola viša kod biljaka izlaganih tri dana stresu solima, nego kod biljaka izlaganih tri nedelje stresu solima.



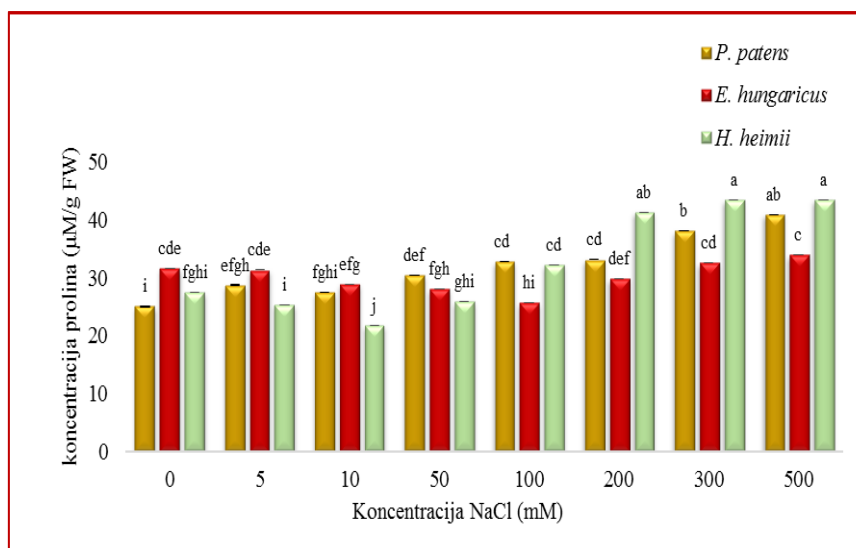
**Grafik 19.** Koncentracija ukupnog tokoferola kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Koncentracija ukupnog tokoferola kod biljaka izlaganih tri nedelje stresu solima varira u zavisnosti od ispitivane vrste (grafik 19) i od primenjene koncentracije NaCl. Najviša koncentracija ukupnog tokoferola se uočava kod vrste *H. heimii* koja je tretirana sa 50 i 100 mM NaCl, a daljim porastom koncentracije soli dolazi do opadanje koncentracije ukupnog tokoferola. Kod vrste *H. heimii* na koncentracijama soli od 5-100 mM NaCl uočava se da je sadržaj ukupnog tokoferola viši kod biljaka koje su stresu solima izlagane kraći vremenski period. Kod vrste *E. hungaricus* može se uočiti da kontrolna grupa biljaka ima višu koncentraciju ukupnog tokoferola (102.45 ug/g DW) u odnosu na biljke tretirane solima. Povećanjem koncentracije soli od 50-500 mM NaCl kod vrste *E. hungaricus* uočava se linearan pad vrednosti ukupnog tokoferola. Najniže vrednosti kako pojedinačnih tokoferola, tako i ukupnog tokoferola uočeni su kod vrste *P. patens*. Kod vrste *P. patens* postoji značajna razlika kada je u pitanju vreme izlaganja biljaka različitim koncentracijama NaCl.

#### 4.7. Uticaj stresa solima na koncentraciju prolina i slobodnih aminokiselina mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u uslovima *in vitro*

Koncentracija prolina i odnosa sadržaja prolina i slobodnih amino kiselina u analizirana je s ciljem utvrđivanja stepena osmotskog prilagođavanja odabranih vrsta mahovina na stres izazvan povećanom koncentracijom NaCl u hranljivoj podlozi.

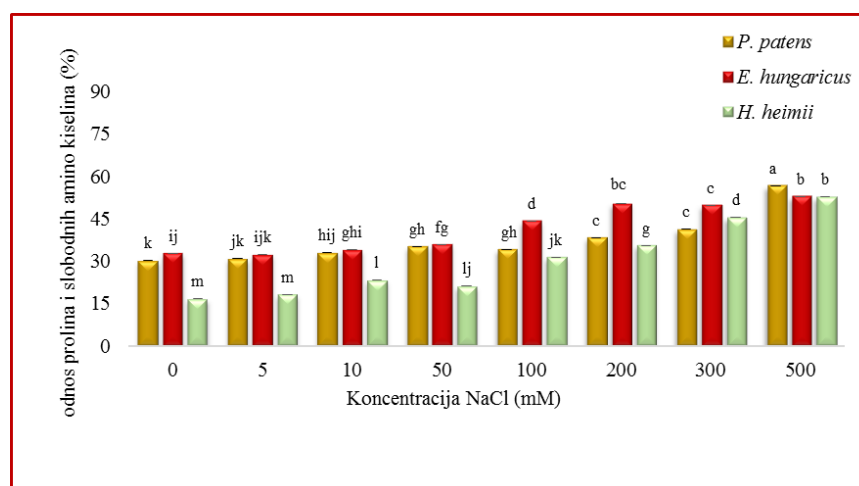
Praćena je količina prolina i slobodnih amino kiselina kod biljaka koje su bile izložene kratkotrajnom (tokom tri dana) i dugotrajnom (tokom tri nedelje) stresu solima. Na osnovu dobijenih rezultata uočava se značajno različit trend u količini prolina kod ove dve grupe biljaka.



**Grafik 20.** Sadržaj prolina kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Kada je u pitanju koncentracija prolina kod biljaka koje su gajene tri dana na podlozi sa NaCl (kratkotrajni stres) (grafik 20), uočava se da koncentracija prolina na nižim koncentracijama soli ne varira statistički značajno. Kod vrste *H. heimii* tek pri tretmanu od 200 mM NaCl, dolazi do statistički značajnog porasta sadržaja prolina, a takav trend se zadržava i pri tretmanu od 300 i 500 mM NaCl. Kod vrste *P. patens* zapaža se da u odnosu na kontrolnu grupu biljaka koncentracija prolina raste linearno sa

porastom koncentracije soli. *E. hungaricus* na svim primenjenim koncentracijama NaCl pokazuje približne vrednosti sadržaja prolina (oko 30  $\mu\text{M/g}$  FW). Vrsta *E. hungaricus* ima veću količinu prolina na niskim koncentracijama soli (5 i 10 mM NaCl) u odnosu na druge dve ispitivane vrste, dok na koncentracijama od 300 i 500 mM NaCl pokazuje nižu vrednost u odnosu na druge dve ispitivane vrste.

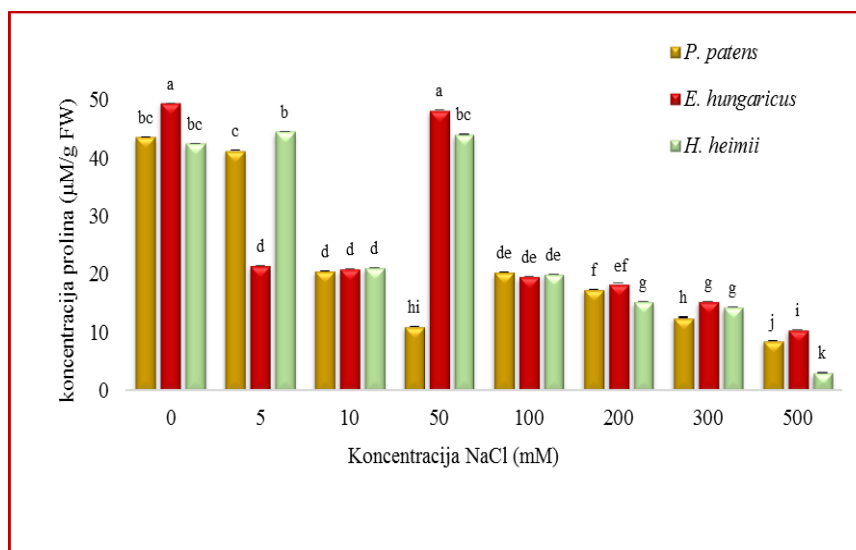


**Grafik 21.** Odnos sadržaja prolina i slobodnih amino kiselina kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

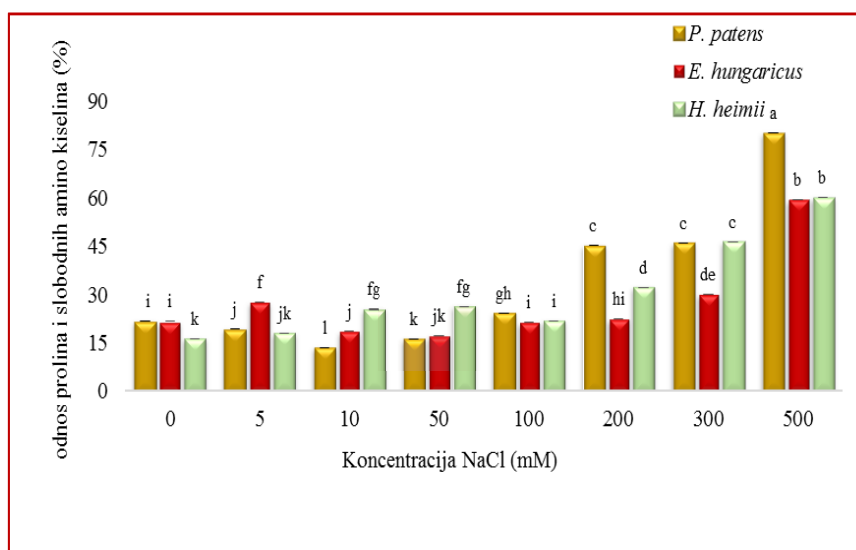
Rezultati dobijeni za odnos sadržaja prolina i slobodnih amino kiselina (grafik 21) pokazuju da kod vrste *H. heimi* porastom koncentracije NaCl, raste odnos sadržaja prolina i slobodnih amino kiselina. Sličan trend se može uočiti i kod vrsta *E. hungaricus* i *P. patens*. ANOVA analiza je pokazala da na koncentraciju prolina i odnos sadržaja prolina i slobodnih aminokiselina presudni značaj ima koncentracija primenjenog NaCl, a ne ispitivana vrsta.

Na osnovu dobijenih rezultata sadržaja prolina kod biljaka gajenih tri nedelje na hranljivom medijumu sa dodatim različitim koncentracijama soli (grafik 22) se uočava da visoke koncentracije soli kod sve tri ispitivane vrste rezultiraju niskim sadržajem prolina u tkivu ispitivanih vrsta mahovina, a da odnos sadržaja prolina i slobodnih amino kiselina na visokim koncentracijama NaCl raste (grafik 21). Najznačajnije

opadanje vrednosti koncentracije prolina koje je i statistički značajano zapaža se pri najvišim koncentracijama NaCl (500 mM), kod sve tri ispitivane vrste.



**Grafik 22.** Sadržaj prolina kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).



**Grafik 23.** Odnos sadržaja prolina i slobodnih amino kiselina kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 22, 23), zapaža se da kod obe fakultativno halofitne vrste (*E. hungaricus* i *H. heimii*) dolazi do naglog porasta koncentracije prolina pri tretmanu od 50 mM NaCl, a da se odnos prolina i slobodnih amino kiselina statistički ne razlikuje u odnosu na niže primenjene koncentracije NaCl. Kod vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* porast koncentracije soli iznad 50 mM dovodi do linearnog opadanja vrednosti sadržaja prolina u biljkama, dok je odnos sadržaja prolina i slobodnih amino kiselina, tj. udeo prolina u ukupnim amino kiselinama, na visokim koncentracijama soli statistički značajno veći u odnosu na kontrolnu grupu biljaka. Kao u slučaju kratkotrajnog izlaganja biljaka solima i za biljke koje su izlagane stresu solima tokom tri nedelje ANOVA analizom je pokazano da faktor koji statistički najznačajnije utiče na sadržaj prolina kod ispitivanih vrsta jeste koncentracija primenjenog NaCl.

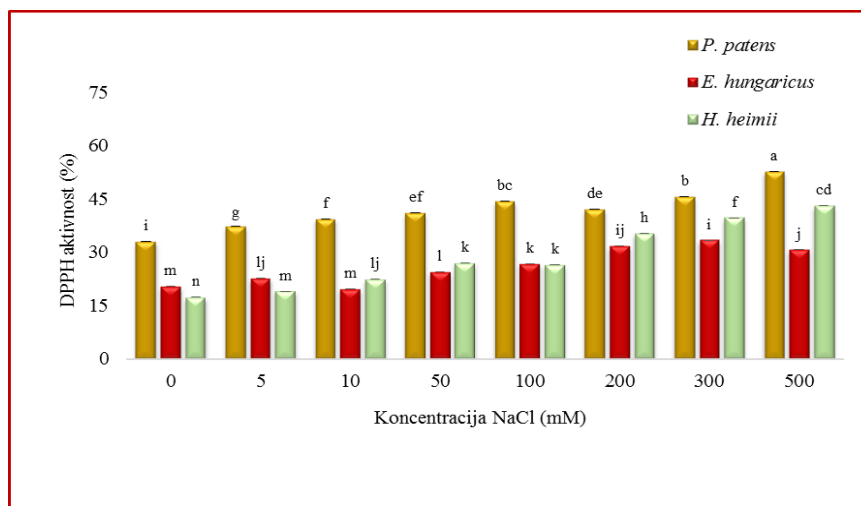
#### **4.8. Uticaj stresa solima na antioksidativni kapacitet i sadržaj ukupnih fenola mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u uslovima *in vitro***

Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* raslih u uslovima *in vitro* i tretiranih različitim koncentracijama soli tokom tri dana i tri nedelje eksperimenta ispitivana je pomoću dve metode, neutralizacija DPPH radikala i Folin - Ciocalteu testom kao pokazateljem ukupne količine fenolnih jedinjenja u biljci.

##### **4.8.1. Antioksidativna aktivnost ispitivana DPPH metodom**

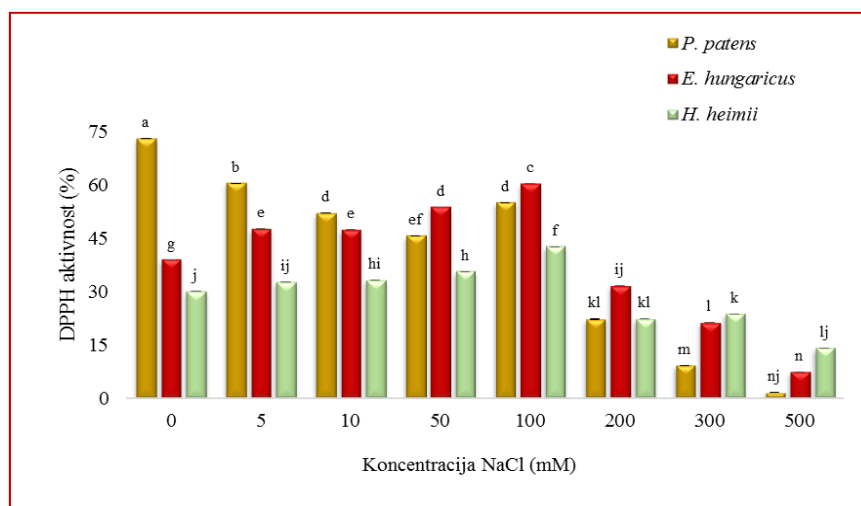
DPPH antioksidativni test se najčešće koristi za određivanje sposobnosti sekundarnih metabolita prisutnih u ekstraktima pojedinih biljaka da predaju vodonikov atom slobodnim radikalima.





**Grafik 24.** DPPH aktivnost kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Kod biljaka koje su bile izlagane stresu solima tokom tri dana maksimalna DPPH aktivnost od 55% zabeležena je kod vrste *P. patens* pri tretmanu sa 500 mM NaCl (grafik 24). DPPH aktivnost kod ove vrste raste sa porastom koncentracije NaCl i značajno je viša nego kod druge dve ispitivane vrste. Sličan trend porasta aktivnosti DPPH imaju i vrste *E. hungaricus* i *H. heimii*.



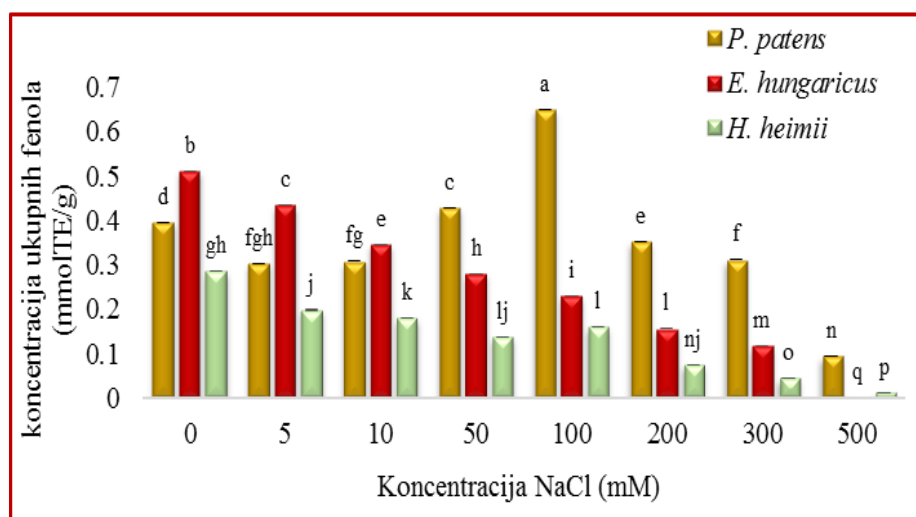
**Grafik 25.** DPPH aktivnost kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 25) uočava se obrnut trend kod biljaka koje su bile na izložene solima tokom tri nedelje. Tokom dugotrajnog stresa DPPH aktivnost kod vrste *P. patens* opada sa povećanjem koncentracije soli, a kod vrsta *E.hungaricus* i *H.heimii* uočen je porast DPPH aktivnosti na koncentracijama NaCl od 5-100 mM. Daljim porastom koncentracije NaCl (200-500 mM) u hranljivoj podlozi opada DPPH aktivnost. DPPH aktivnost se kod vrste *H. heimi* kreće u intervalu od 30-40% pri tretmanu NaCl od 0-100 mM, a na visokim koncentracijama aktivnost opada ispod 30%.Aktivnost DPPH na najvišoj koncentraciji za vrstu *P. patens* iznosi 3%, a za vrstu *E. hungaricus* 12%.

#### 4.8.2. Određivanje sadržaja polifenolnih jedinjenja Folin–Ciocalteu-ovom metodom

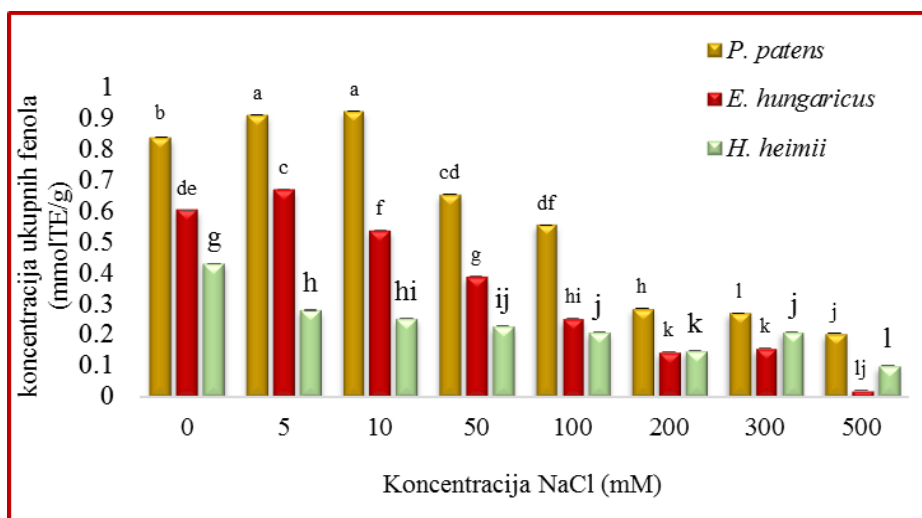
Sadržaj ukupnih fenola određen je po Folin–Ciocalteu metodi i njihova količina je izražena u ekvivalentima galne kiseline.

Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 26) uočava se da kod fakultativno halofitnih vrsta koje su ispitivane dolazi do opadanja koncetracije ukupnih fenola, a da kod vrste *P. patens* raste koncentracija ukupnih fenola. Najviša koncentracija za vrstu *P. patens* je na tretmanu sa dodatkom 50 mM NaCl. Vrste *E. hungaricus* i *H. heimii* inaju najvišu koncetraciju fenola kod kontrolne grupe biljaka.



**Grafik 26.** Koncentracija ukupnih fenola kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD test

Kod biljaka gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa dodatko NaCl, trend rasta/opadanja koncentracije ukupnih fenola je sličan kao i kod biljaka koje su bile izložene tri dana stresu solima. Najviša koncentracija ukupnih fenola prisutna je kod vrste *P. patens*, kod koje dolazi do povećanja koncentracije fenola u odnosu na kontrolu. Povećanje se uočava kod biljaka koje su gajene na podlozi sa dodatko 5 i 10 mM NaCl (grafik 27). Na najvišoj primenjenoj koncentraciji soli od 500 mM NaCl, uočava se da je kod biljaka izlaganih dugotrajnom stresu visa koncentracija fenola nego kod biljaka izlaganih kratkotrajnom stresu.



**Grafik 27.** Koncentracija ukupnih fenola kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

#### 4.8.3. UHPLC/-HESI-MS/MS analiza fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u uzorcima urađena je u SRM (eng. *Single Reaction Monitoring*) eksperimentu, koji predstavlja najosetljiviji tipa analize instrumenta, a koji se zasniva na odabiru pre definisanih masenih fragmenata, tj. produkt-jona, koji pokazuju najveći intenzitetu PIS (eng. *Product Ion Scanning*) eksperimentu (Tabela 21). Xcalibur softver (verzija 2.1) je korišćen za kontrolu instrumenta, kao i za prikupljanje i obradu podataka.

**Tabela 21.** Fenolna jedinjenja identifikovana i kvantifikovana *UHPLC-qqq MS* analizom u metanolnim ekstraktima mahovina *P.patens*, *E.hungaricus* i *H. heimii*. Predstavljani su MS i MS<sup>2</sup> podaci.

| Fenoli                |                                         |                            |                                   |                                                             |        |
|-----------------------|-----------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------|
| Br.                   |                                         | <i>t<sub>R</sub></i> [min] | [M-H] <sup>+</sup> [ <i>m/z</i> ] | MS <sup>2</sup> fragmenti [ <i>m/z</i> ] (intezitet pikova) | cE[eV] |
| Hydroxycinnamic acids |                                         |                            |                                   |                                                             |        |
| 1                     | Kafeinska kiselina <sup>a</sup>         | 3,10                       | 179                               | 135 (100); 134 (85); 117 (15); 89 (10); 63 (5)              | 30     |
| 2                     | <i>p</i> -kumarna kiselina <sup>a</sup> | 4,23                       | 163                               | 119 (100); 117 (20); 104 (5); 93 (50); 91 (8)               | 30     |
| Flavons               |                                         |                            |                                   |                                                             |        |
| 3                     | Apigetrin <sup>a</sup>                  | 5,86                       | 431                               | 269 (20); 268 (100); 239 (<5); 211 (<5); 150 (<5)           | 30     |
| 4                     | Apigenin <sup>a</sup>                   | 7,11                       | 269                               | 225 (5); 159 (<5); 151 (20); 149 (10); 117 (100); 107 (20)  | 30     |
| Flavonols             |                                         |                            |                                   |                                                             |        |
| 8                     | Rutin <sup>a</sup>                      | 5,15                       | 609                               | 301 (20); 300 (100); 255 (15); 226 (<5)                     | 30     |
| 9                     | Isokvercitrin <sup>a</sup>              | 5,33                       | 463                               | 300 (100); 255 (30); 243 (<5)                               | 30     |
| 10                    | Astragalin <sup>a</sup>                 | 5,68                       | 447                               | 300 (40); 284 (100); 255 (80); 227 (45); 151 (<5)           | 30     |
| 12                    | Kaempferol <sup>a</sup>                 | 7,12                       | 285                               | 239 (10); 227 (10); 211 (<5); 157 (10); 93 (8)              | 30     |
| Flavanons             |                                         |                            |                                   |                                                             |        |
| 13                    | Naringenin <sup>a</sup>                 | 6,89                       | 271                               | 228 (<5); 184 (5); 151 (15); 119 (100); 107 (30)            | 30     |

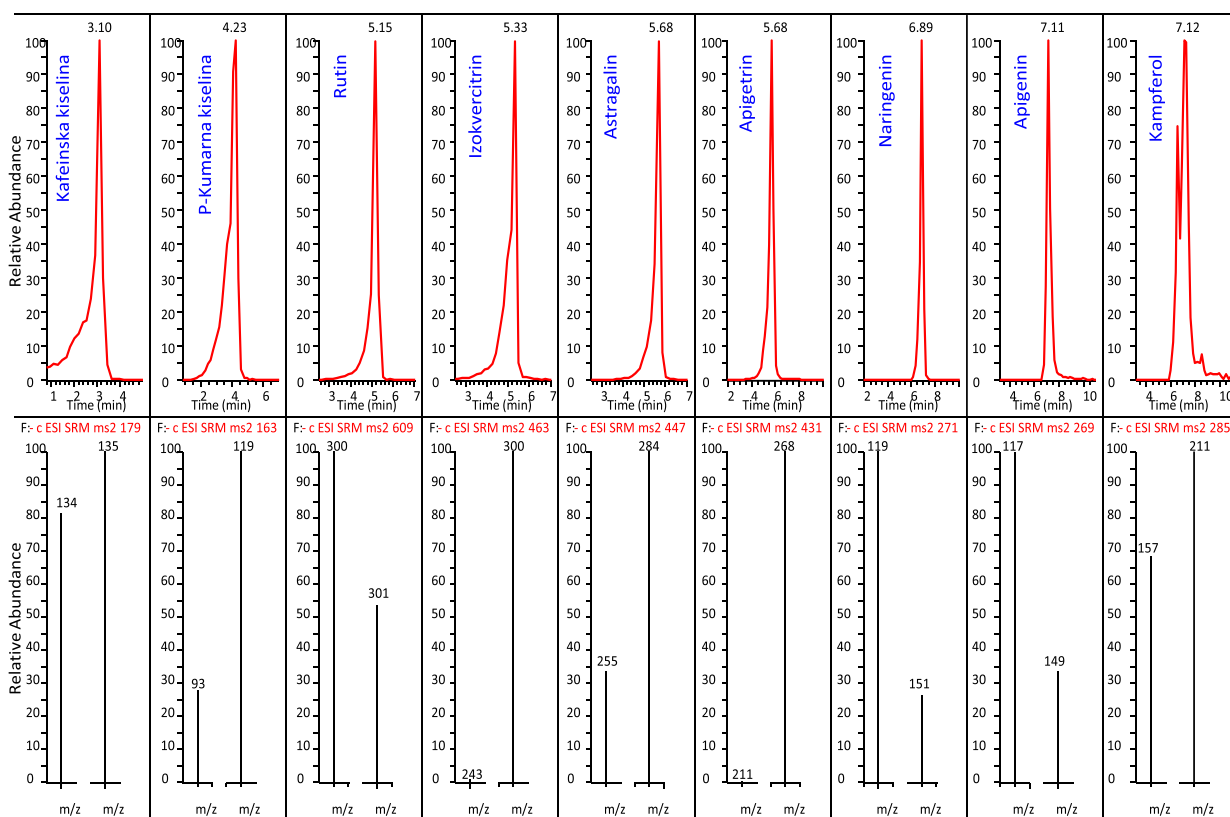
<sup>a</sup>Potvrđeno pomoću standarda.

cE- koliziona energija

*t<sub>R</sub>*- retenciono vreme

Crvenom bojom su obeleženi MS<sup>2</sup>fragmenti koji su korišćeni u SRM eksperiment

Fenoli su u uzorcima identifikovani na osnovu MS i MS/MS spektara, retencionih vremena tokom hromatografskog razdvajanja i poređenjem sa standardima. Identifikacija je potvrđena u FS, PIS i SRM eksperimentima (slika 26). Linearna regresiona analiza kalibracionih kriva analiziranih fenolnih jedinjenja je pokazala odličnu linearnost, uz korelacione koeficijente od  $r = 0.999$ ,  $p < 0.001$ . Kvantifikacija fenolnih jedinjanja u uzorcima je urađena na osnovu površine pikova u SRM eksperimentu.



**Slika 26.** Hromatogram-legenda: UHPLC/ $\pm$ MS<sup>2</sup> hromatogrami standarda fenolnih jedinjenja (gornji red), i njihovi karakterisitčni MS<sup>2</sup> spektri u SRM eksperimentu (donji red).

**Tabela 22.** Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja prisutnih kod ispitivanih vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* izlaganih tri dana stresu solima. (Koncentracija soli je izražena u mM. Vrednosti u tabeli predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja  $\pm$  standardna greška i izražene su u ng/100 mg sveže mase.)

| VRSTA                | konc. soli | kafeinska kiselina | p kumapna kiselina | rutin           | izokvercetin    | astragalin      | apigetrin       | apigenin        | naringerin      | kamfeferol        |
|----------------------|------------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| <i>P. patens</i>     | 0          | 0,01 $\pm$ 0,015   | 22,50 $\pm$ 1,58   | 3,04 $\pm$ 0,31 | 7,22 $\pm$ 0,35 | 1,82 $\pm$ 0,14 | 6,34 $\pm$ 1,58 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 1,97 $\pm$ 0,73 | 62,05 $\pm$ 17,32 |
|                      | 5          | 0,30 $\pm$ 0,00    | 21,15 $\pm$ 5,92   | 0,83 $\pm$ 0,36 | 4,89 $\pm$ 0,74 | 2,03 $\pm$ 0,85 | 5,94 $\pm$ 1,68 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,68 $\pm$ 0,20 | 4,05 $\pm$ 0,05   |
|                      | 10         | 2,01 $\pm$ 0,84    | 11,15 $\pm$ 1,02   | 0,05 $\pm$ 0,02 | 4,20 $\pm$ 0,60 | 0,95 $\pm$ 0,37 | 2,82 $\pm$ 0,37 | 2,85 $\pm$ 1,20 | 0,45 $\pm$ 0,28 | 3,21 $\pm$ 0,84   |
|                      | 50         | 3,01 $\pm$ 0,84    | 50,15 $\pm$ 3,44   | 0,17 $\pm$ 0,00 | 2,86 $\pm$ 0,41 | 0,25 $\pm$ 0,05 | 2,18 $\pm$ 0,18 | 2,77 $\pm$ 0,39 | 0,60 $\pm$ 0,34 | 0,56 $\pm$ 0,03   |
|                      | 100        | 0,72 $\pm$ 0,66    | 29,72 $\pm$ 11,20  | 0,44 $\pm$ 0,02 | 2,15 $\pm$ 0,70 | 0,47 $\pm$ 0,32 | 0,45 $\pm$ 0,10 | 1,10 $\pm$ 0,24 | 0,42 $\pm$ 0,35 | 0,51 $\pm$ 0,01   |
|                      | 200        | 0,30 $\pm$ 0,15    | 10,37 $\pm$ 0,37   | 0,12 $\pm$ 0,00 | 1,06 $\pm$ 0,36 | 0,22 $\pm$ 0,02 | 0,21 $\pm$ 0,05 | 0,56 $\pm$ 0,10 | 0,06 $\pm$ 0,03 | 1,01 $\pm$ 0,21   |
|                      | 300        | 1,77 $\pm$ 0,94    | 6,47 $\pm$ 2,15    | 0,21 $\pm$ 0,21 | 0,99 $\pm$ 0,62 | 0,13 $\pm$ 0,09 | 0,39 $\pm$ 0,12 | 0,45 $\pm$ 0,13 | 0,16 $\pm$ 0,07 | 1,53 $\pm$ 0,46   |
|                      | 500        | 54,19 $\pm$ 15,04  | 58,51 $\pm$ 11,64  | 0,23 $\pm$ 0,23 | 3,01 $\pm$ 0,95 | 1,58 $\pm$ 0,62 | 7,26 $\pm$ 2,72 | 2,77 $\pm$ 2,77 | 0,83 $\pm$ 0,43 | 4,93 $\pm$ 0,06   |
| <i>E. hungaricus</i> | 0          | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,61 $\pm$ 0,40    | 4,29 $\pm$ 0,29 | 1,10 $\pm$ 0,18 | 0,36 $\pm$ 0,09 | 1,51 $\pm$ 0,10 | 1,22 $\pm$ 0,78 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00   |
|                      | 5          | 0,02 $\pm$ 0,02    | 2,29 $\pm$ 1,65    | 1,03 $\pm$ 0,25 | 0,84 $\pm$ 0,10 | 0,10 $\pm$ 0,01 | 0,99 $\pm$ 0,41 | 0,67 $\pm$ 0,22 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00   |
|                      | 10         | 0,02 $\pm$ 0,02    | 2,44 $\pm$ 0,93    | 0,83 $\pm$ 0,44 | 0,79 $\pm$ 0,06 | 0,05 $\pm$ 0,00 | 0,24 $\pm$ 0,05 | 1,56 $\pm$ 0,23 | 0,02 $\pm$ 0,02 | 0,00 $\pm$ 0,00   |
|                      | 50         | 0,27 $\pm$ 0,27    | 1,26 $\pm$ 0,23    | 0,54 $\pm$ 0,25 | 0,47 $\pm$ 0,22 | 0,09 $\pm$ 0,02 | 0,11 $\pm$ 0,04 | 0,42 $\pm$ 0,28 | 0,11 $\pm$ 0,05 | 0,00 $\pm$ 0,00   |
|                      | 100        | 0,50 $\pm$ 0,05    | 6,44 $\pm$ 1,02    | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,37 $\pm$ 0,11 | 0,12 $\pm$ 0,05 | 0,06 $\pm$ 0,06 | 0,23 $\pm$ 0,09 | 0,24 $\pm$ 0,05 | 0,36 $\pm$ 0,36   |
|                      | 200        | 0,00 $\pm$ 0,00    | 24,69 $\pm$ 1,81   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 1,24 $\pm$ 0,90 | 1,26 $\pm$ 1,23 | 3,35 $\pm$ 2,38 | 0,25 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,40 $\pm$ 0,40   |
|                      | 300        | 0,05 $\pm$ 0,05    | 7,52 $\pm$ 2,08    | 0,08 $\pm$ 0,05 | 1,77 $\pm$ 1,15 | 0,42 $\pm$ 0,12 | 1,43 $\pm$ 0,20 | 0,27 $\pm$ 0,27 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 1,46 $\pm$ 0,18   |
|                      | 500        | 0,02 $\pm$ 0,02    | 3,34 $\pm$ 2,16    | 0,02 $\pm$ 0,01 | 0,60 $\pm$ 0,23 | 0,35 $\pm$ 0,24 | 0,93 $\pm$ 0,54 | 0,21 $\pm$ 0,21 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 1,75 $\pm$ 0,62   |
| <i>H. heimii</i>     | 0          | 0,10 $\pm$ 0,00    | 0,03 $\pm$ 0,03    | 1,18 $\pm$ 0,09 | 0,54 $\pm$ 0,29 | 0,57 $\pm$ 0,24 | 0,40 $\pm$ 0,04 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00   |
|                      | 5          | 0,12 $\pm$ 0,01    | 0,46 $\pm$ 0,46    | 0,80 $\pm$ 0,00 | 0,50 $\pm$ 0,22 | 0,01 $\pm$ 0,01 | 0,21 $\pm$ 0,10 | 0,16 $\pm$ 0,16 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00   |
|                      | 10         | 0,14 $\pm$ 0,00    | 3,98 $\pm$ 1,29    | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,40 $\pm$ 0,12 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,27 $\pm$ 0,05 | 0,02 $\pm$ 0,02 | 0,47 $\pm$ 0,21 | 0,00 $\pm$ 0,00   |
|                      | 50         | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,51 $\pm$ 0,07    | 0,03 $\pm$ 0,03 | 0,69 $\pm$ 0,03 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,39 $\pm$ 0,20 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,68 $\pm$ 0,31 | 0,84 $\pm$ 0,84   |
|                      | 100        | 0,00 $\pm$ 0,00    | 1,07 $\pm$ 0,03    | 0,01 $\pm$ 0,01 | 1,40 $\pm$ 1,40 | 0,11 $\pm$ 0,06 | 0,20 $\pm$ 0,05 | 0,05 $\pm$ 0,05 | 0,78 $\pm$ 0,37 | 0,33 $\pm$ 0,33   |
|                      | 200        | 0,00 $\pm$ 0,00    | 2,04 $\pm$ 0,04    | 0,08 $\pm$ 0,03 | 0,66 $\pm$ 0,23 | 0,08 $\pm$ 0,07 | 0,18 $\pm$ 0,04 | 0,07 $\pm$ 0,04 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,16 $\pm$ 0,16   |
|                      | 300        | 0,07 $\pm$ 0,03    | 3,65 $\pm$ 0,32    | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,87 $\pm$ 0,27 | 0,02 $\pm$ 0,02 | 0,17 $\pm$ 0,02 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 1,16 $\pm$ 0,58 | 0,00 $\pm$ 0,00   |
|                      | 500        | 0,03 $\pm$ 0,03    | 6,94 $\pm$ 0,29    | 0,00 $\pm$ 0,00 | 1,04 $\pm$ 0,53 | 0,05 $\pm$ 0,03 | 0,04 $\pm$ 0,03 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00   |



Kod biljaka izlaganih tri dana stresu solima detektovano je prisustvo devet različitih fenolnih jedinjenja (tabele 22). Detektovane su dve fenolne kiseline (kafeinska i p kumarna kiselina). Vrsta *P. patens* ima značajno višu količinu ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na vrste *E. hungaricus* i *H. heimii*. Količina kafeinske kiseline kod vrste *P. patens* raste sa povećanjem koncentracije soli do 50 mM NaCl, kod biljaka koje su izlagane tri dana stresu solima. Najviša koncentracija detektovana je pri tretmanu od 500 mM NaCl (54.19 µg/mg), dok kontrolna grupa biljaka sadrži najmanju količinu kafeinske kiseline (0.01 µg/mg).

Kod vrste *E. hungaricus* količina kafeinske kiseline raste sa porastom koncentracije soli do 100 mM NaCl, dok dalji porast koncentracije NaCl dovodi do opadanja količine ove fenolne kiseline u uzorcima. Pri koncentraciji od 200, mM NaCl nije detektovano prisustvo kafeinske kiseline. Kod vrste *H. heimii* koja je izlagana kratkotrajnom stresu od tri dana uočava se da vrednost koncentracije kafeinske kiseline raste sa porastom koncentracije soli do 10 mM NaCl, na tretmanima od 50 do 200 mM NaCl nije detektovano njeno prisustvo, dok je ponovo detektovana na najvišim koncentracijama od 300 i 500 mM NaCl.

Prisustvo p kumarne kiseline detektovano je kod sve tri ispitivane vrste koje su izlagane kratkotrajnom stresu solima. Najniže zabeležene vrednosti uočene su kod vrste *H. heimii*. Kod vrste *P. patens* pri tretmanu od 100 mM NaCl zabeležena je najviša vrednost p kumarne kiseline od 29.72 ng/100 mg sveže mase, dok je kod vrste *E. hungaricus* najviša vrednost ove kiseline zabeležena pri tretmanu od 200 mM NaCl i iznosila je 24.69 ng/100 mg sveže mase. Kod vrste *H. heimii* najveća zabeležena vrednost koncentracije p kumarne kiseline uočena je pri tretmanu sa 500 mM NaCl.

Najviše koncentracije rutina detektovane su kod kontrolne grupe biljaka sve tri ispitivane vrste koje su izlagane kratkotrajnom stresu solima. Količina kaemferola je najviša kod vrste *P. patens*, dok je kod druge dve ispitivane vrste mahovina detektovana u tragovima. Kod vrste *E. hungaricus* prisustvo kaemferola nije detektovano kod kontrolne grupe biljaka i na niskim koncentracijama soli od 5 do 50 mM NaCl, tek na koncentracijama soli višim od 100 mM NaCl, detektovano je prisustvo kaemferola kod ove vrste. Kod vrste *P. patens* najviša količina kaemferola detektovana je kod kontrolne grupe biljaka i iznosila je 62.05 ng/100 mg svežeg materijala. Prisustvo kaemferola kod vrste

*H. heimii* detektovano je pri tretmanima solima u opsegu koncentracija između 50 i 200 mM NaCl.

Količina izokvercitina kod vrsta *P. patens* i *E. hungaricus* opada sa porastom koncentracije soli. Međutim, kod *P. patens* je zabeležen porast na najvišoj koncentraciji soli od 500 mM NaCl, gde je zabeležena vrednost od 3.01 ng/100 mg svežeg materijala, dok je kod vrste *E. hungaricus* porast sadržaja ovog glikozida zabeležen na koncentracijama soli od 200 i 300 mM NaCl. Količina izokvercetina kod vrste *H. heimii* je najveća pri tretmanu solima od 100 mM NaCl i iznosi 1.40 ng/100 mg svežeg biljnog materijala.

Naringerin nije detektovan kod kontrolne grupe biljaka niti pri najnižem tretmanu solima od 5 mM NaCl kod vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* koje su izlagane tri dana stresu solima. Kod vrste *P. patens* je zabeležena najviša koncentracija naringerina u kontrolnoj grupi biljaka (1.97 ng/100 mg svežeg biljnog materijala), a dalji porast koncentracije NaCl dovodi do opadanja sadržaja ovog jedinjenja u biljkama.

Koncentracija astragalina, apigetrina i apigenina u biljkama *H. heimii* nije uslovljena koncentracijom soli u hranljivoj podlozi. Ova vrsta mahovine takođe poseduje niže vrednosti ovih jedinjenja od druge dve ispitivane vrste. Apigetrin kod vrste *P. patens* opada sa porastom koncentracije soli, do koncentracije NaCl od 500 mM, kada se uočava značajan porast vrednosti, dok apigenin nije detektovan na koncentracijama od 0 i 5 mM NaCl. Kod vrste *E. hungaricus* se uočava značajno povećanje koncentracije astragalina i apigetrina na tretmanu od 200 mM NaCl. Na koncentracijama soli od 300 i 500 mM NaCl nije detektovan apigenin kod vrste *H. heimii*, kao ni u kontrolnoj grupi biljaka.

Na kratkotrajnom tretmanu solima od 500 mM, među svim detektovanim fenolnim jedinjenjima, najviša je količina p-kumarne kiseline kod sve tri ispitivane vrste. Uočene su razlike u kvalitativnom sastavu fenolnih jedinjenja između kontrolnih biljaka i onih izloženih ekstremnim koncentracijama NaCl (500 mM). Kod vrste *P. patens* pri tretmanu od 500 mM NaCl detektovano je devet fenolnih jedinjenja, kod vrste *E. hungaricus* osam, a kod vrste *H. heimii* pet fenolnih jedinjenja. Kod kontrolne grupe biljaka kod vrste *P. patens* detektovano je osam fenolnih jedinjenja, a kod druge dve ispitivane vrste po šest fenolnih jedinjenja.



**Tabela 23.** Kvalitativna i kvantitativna analiza fenolnih jedinjenja prisutnih kod ispitivanih vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* izlaganih tri nedelje stresu solima. (Koncentracija soli je izražena u mM. Vrednosti u tabeli predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna merenja  $\pm$  standardna greška i izražene su u ng/100 mg.)

| VRSTA                | konc. soli | kafeinska kiselina | p kumarna kiselina | rutin           | izokvercetin    | astragalin      | apigetrin       | apigenin        | naringerin      | kampeferol      |
|----------------------|------------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>P. patens</i>     | 0          | 0,19 $\pm$ 0,09    | 83,74 $\pm$ 21,37  | 0,02 $\pm$ 0,00 | 0,74 $\pm$ 0,49 | 0,11 $\pm$ 0,05 | 0,84 $\pm$ 0,04 | 0,22 $\pm$ 0,02 | 2,36 $\pm$ 0,62 | 2,00 $\pm$ 1,41 |
|                      | 5          | 1,14 $\pm$ 0,19    | 39,60 $\pm$ 1,80   | 0,54 $\pm$ 0,21 | 0,41 $\pm$ 0,15 | 0,11 $\pm$ 0,09 | 0,08 $\pm$ 0,02 | 0,27 $\pm$ 0,02 | 0,67 $\pm$ 0,06 | 2,89 $\pm$ 0,13 |
|                      | 10         | 1,50 $\pm$ 0,34    | 37,01 $\pm$ 2,01   | 0,37 $\pm$ 0,08 | 0,44 $\pm$ 0,26 | 0,16 $\pm$ 0,13 | 0,07 $\pm$ 0,07 | 0,35 $\pm$ 0,00 | 0,16 $\pm$ 0,04 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 50         | 1,80 $\pm$ 0,57    | 28,40 $\pm$ 2,37   | 0,06 $\pm$ 0,04 | 0,23 $\pm$ 0,02 | 0,03 $\pm$ 0,03 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,68 $\pm$ 0,01 | 0,13 $\pm$ 0,02 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 100        | 2,80 $\pm$ 0,91    | 150,55 $\pm$ 9,05  | 0,13 $\pm$ 0,00 | 0,32 $\pm$ 0,13 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,51 $\pm$ 0,00 | 0,09 $\pm$ 0,04 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 200        | 4,18 $\pm$ 0,26    | 150,07 $\pm$ 30,15 | 0,47 $\pm$ 0,02 | 0,57 $\pm$ 0,00 | 0,43 $\pm$ 0,03 | 0,03 $\pm$ 0,02 | 0,43 $\pm$ 0,03 | 0,15 $\pm$ 0,15 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 300        | 5,09 $\pm$ 0,07    | 39,37 $\pm$ 1,16   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,29 $\pm$ 0,00 | 0,08 $\pm$ 0,00 | 0,18 $\pm$ 0,09 | 0,21 $\pm$ 0,01 | 0,04 $\pm$ 0,04 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 500        | 5,55 $\pm$ 0,55    | 19,37 $\pm$ 1,28   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,26 $\pm$ 0,08 | 0,05 $\pm$ 0,02 | 0,23 $\pm$ 0,15 | 0,18 $\pm$ 0,00 | 0,02 $\pm$ 0,02 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
| <i>E. hungaricus</i> | 0          | 0,07 $\pm$ 0,03    | 9,24 $\pm$ 4,83    | 0,05 $\pm$ 0,05 | 0,71 $\pm$ 0,01 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,54 $\pm$ 0,31 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 5          | 0,04 $\pm$ 0,00    | 9,60 $\pm$ 7,04    | 0,02 $\pm$ 0,02 | 0,32 $\pm$ 0,02 | 0,02 $\pm$ 0,00 | 0,08 $\pm$ 0,07 | 0,37 $\pm$ 0,02 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,16 $\pm$ 0,22 |
|                      | 10         | 0,00 $\pm$ 0,00    | 65,56 $\pm$ 12,72  | 0,03 $\pm$ 0,03 | 0,67 $\pm$ 0,47 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,12 $\pm$ 0,10 | 0,13 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 50         | 0,00 $\pm$ 0,00    | 16,61 $\pm$ 3,53   | 0,11 $\pm$ 0,02 | 0,93 $\pm$ 0,24 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,07 $\pm$ 0,07 | 0,13 $\pm$ 0,00 | 0,08 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 100        | 0,00 $\pm$ 0,00    | 4,98 $\pm$ 2,13    | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,19 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,27 $\pm$ 0,27 | 0,75 $\pm$ 0,05 | 0,09 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 200        | 0,00 $\pm$ 0,00    | 34,85 $\pm$ 12,59  | 0,04 $\pm$ 0,04 | 0,17 $\pm$ 0,02 | 0,05 $\pm$ 0,05 | 0,31 $\pm$ 0,28 | 0,62 $\pm$ 0,02 | 0,12 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 300        | 0,08 $\pm$ 0,01    | 0,75 $\pm$ 0,17    | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,16 $\pm$ 0,01 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,04 $\pm$ 0,02 | 0,25 $\pm$ 0,00 | 0,11 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 500        | 0,00 $\pm$ 0,00    | 0,40 $\pm$ 0,40    | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,27 $\pm$ 0,10 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,03 $\pm$ 0,03 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
| <i>H. heimii</i>     | 0          | 2,10 $\pm$ 0,10    | 1,11 $\pm$ 1,11    | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,55 $\pm$ 0,17 | 0,05 $\pm$ 0,03 | 0,02 $\pm$ 0,02 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,27 $\pm$ 0,39 |
|                      | 5          | 1,03 $\pm$ 0,02    | 8,96 $\pm$ 8,59    | 0,17 $\pm$ 0,00 | 0,42 $\pm$ 0,34 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,10 $\pm$ 0,10 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,25 $\pm$ 0,25 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 10         | 0,03 $\pm$ 0,03    | 6,08 $\pm$ 1,53    | 0,18 $\pm$ 0,00 | 1,69 $\pm$ 0,43 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,42 $\pm$ 0,06 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,18 $\pm$ 0,10 | 0,44 $\pm$ 0,06 |
|                      | 50         | 0,00 $\pm$ 0,00    | 6,56 $\pm$ 1,90    | 0,21 $\pm$ 0,01 | 3,36 $\pm$ 1,35 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,59 $\pm$ 0,27 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,90 $\pm$ 0,90 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 100        | 0,00 $\pm$ 0,00    | 3,79 $\pm$ 1,52    | 0,07 $\pm$ 0,00 | 1,00 $\pm$ 0,11 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 1,05 $\pm$ 0,04 | 0,11 $\pm$ 0,11 | 0,86 $\pm$ 0,06 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 200        | 0,00 $\pm$ 0,00    | 4,04 $\pm$ 0,04    | 0,09 $\pm$ 0,00 | 0,20 $\pm$ 0,08 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 1,06 $\pm$ 0,93 | 0,26 $\pm$ 0,26 | 0,33 $\pm$ 0,33 | 0,00 $\pm$ 0,00 |
|                      | 300        | 0,00 $\pm$ 0,00    | 2,17 $\pm$ 1,31    | 0,32 $\pm$ 0,02 | 1,14 $\pm$ 0,73 | 0,06 $\pm$ 0,01 | 1,51 $\pm$ 0,01 | 0,30 $\pm$ 0,30 | 0,10 $\pm$ 0,10 | 0,15 $\pm$ 0,06 |
|                      | 500        | 0,01 $\pm$ 0,01    | 0,83 $\pm$ 0,49    | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,02 $\pm$ 0,02 | 0,07 $\pm$ 0,06 | 0,01 $\pm$ 0,01 | 0,03 $\pm$ 0,03 | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,48 $\pm$ 0,09 |

Najveća količina fenolnih jedinjenja je prisutna kod vrste *P. patens*, koja je izlagana tri nedelje stresu solima. Kao i kod kratkotrajnog stresa i kod dugotrajnog izlaganja stresu, dominantno fenolno jedinjenje za sve tri ispitivane vrste jeste p kumarna kiselina (tabela 23). Najveće vrednosti p kumarne kiseline zabeležene su kod vrste *P.*

*patens* na tretmanima od 100 (150.55 µg/mg) i 200 mM (150.07 µg/mg) NaCl, dok je kod vrste *H. heimii* vrednost p kumarne kiseline najveća na niskim koncentracijama soli od 5-50 mM NaCl.

Koncentracija kafeinske kiseline kod vrste *P. patens* raste sa porastom koncentracije soli, dok kod druge dve ispitivane vrste dolazi do opadanja sadržaja ove fenolne kiseline. Kod vrste *E. hungaricus* izlagane tri nedelje stresu solima prisustvo kafeinske kiseline detektovano je samo kod kontrolne grupe biljaka i kod biljaka koje su bile na hranljivoj podlozi sa dodatkom soli koncentracije 5 i 300 mM NaCl. Kod vrste *H. heimii* kafeinska kiselina nije detektovana pri tretmanima od 50-300 mM NaCl (tabala 23).

Rutin nije detektovan kod ispitivanih vrsta mahovina izlaganih tri nedelje 500 mM NaCl. Kod vrsta *E. hungaricus* i *P. patens* količina izokvercitrina opada sa porastom koncentracije soli u hranljivoj podlozi, u odnosu na kontrolnu grupu biljaka, dok kod vrste *H. heimii* vrednost izokvercetina je znatno veća u odnosu na kontrolu kod biljaka koje su rasle na hranljivom medijumu sa dodatkom soli u opsegu koncentracija 10-100 mM NaCl.

Vrednosti koncentracije apigenina kod vrste *P. patens* rastu na nižim koncentracijama soli (5-50 mM NaCl) u odnosu na kontrolnu grupu biljaka, dok kod vrste *E. hungaricus* sadržaj apigenina opada. Daljim porastom koncentracija soli, vrednost koncentracija apigenina raste kod obe vrste mahovina. Kod vrste *H. heimii* apigenin nije detektovan na tretmanima od 0 do 50 mM NaCl, dok na koncentracijama soli od 100 mM NaCl i većim raste koncentracija apigenina. Astragalin je detektovan u tragovima kod vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* i to ne na svim koncentracijama soli (tabela 23).

Kaemferol je kod vrste *P. patens* detektovan samo kod kontrolne grupe biljaka i kod biljaka izlaganih najnižoj koncentraciji soli (5 mM NaCl), dok je kod vrste *E. hungaricus* kampeferol zabeležen samo kod biljaka koje su rasle na hranljivom medijumu sa dodatkom soli koncentracije 5 mM NaCl. Kod vrste *H. heimii* detektovan jer kod kontrolne grupe biljaka i kod biljaka koje su rasle na podlozi sa dodatkom NaCl od 300 i 500 mM.

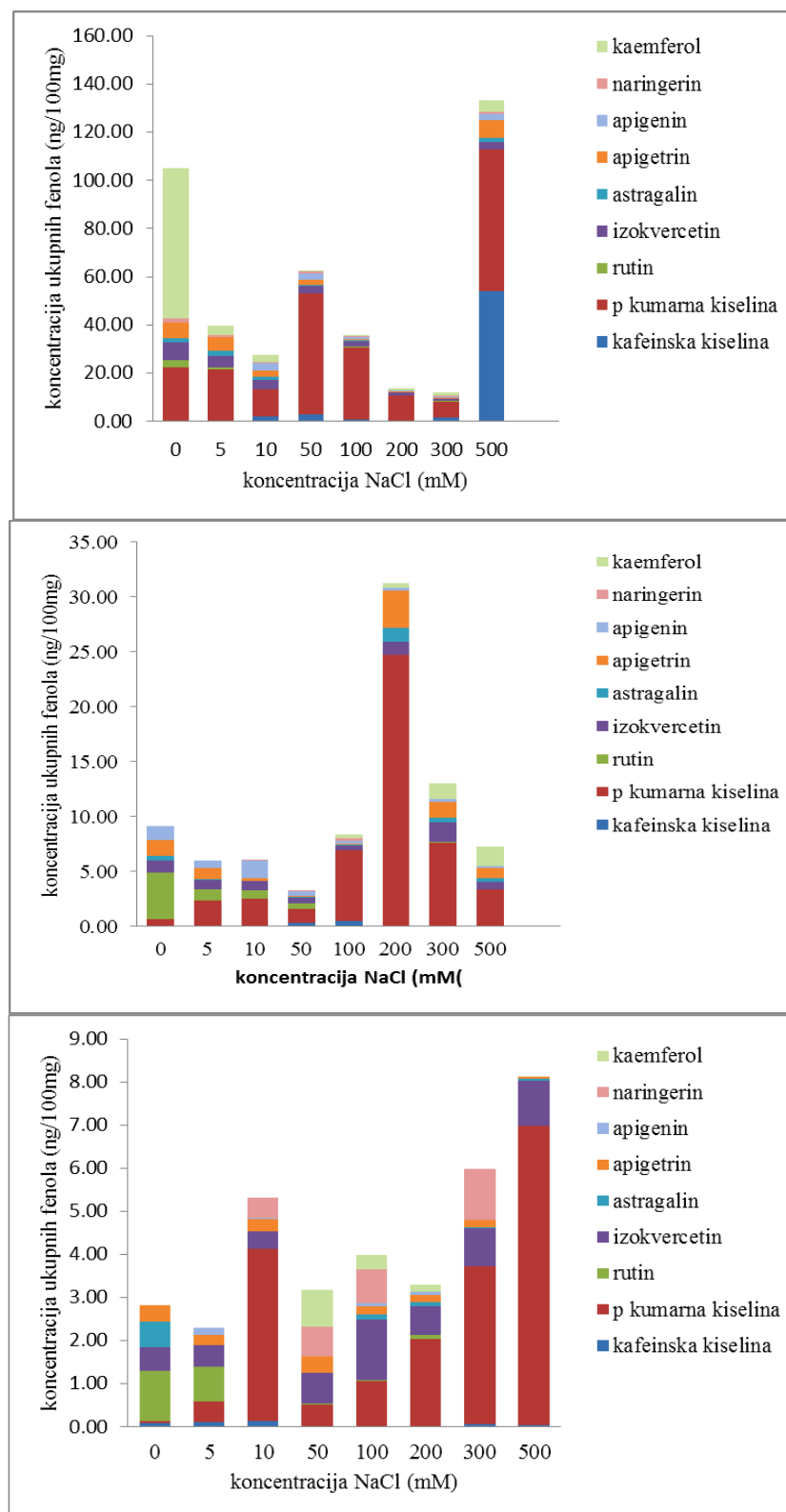
U uslovima kada biljke nisu bile izlagane stresu solima (kontrolne biljke) kod vrste *P. patens* detektovano je devet fenolnih jedinjenja, kod *E. hungaricus* pet, dok je kod *H. heimii* zabeleženo prisustvo šest fenolnih jedinjenja. Na najvećoj primenjenoj koncentraciji soli od 500 mM NaCl kod vrste *P. patens* je detektovano sedam, kod *E. hungaricus* tri, a kod vrste *H. heimii* sedam fenolnih jedinjenja.

Na osnovu prikazanih rezultata (grafik 28) uočava se da je kod vrste *P. patens* najveća koncentracija fenola na hranljivoj podlozi sa dodatkom 500 mM NaCl, a dominantno fenolno jedinjenje je p kumarna kiselina. Kod vrste *E. hungaricus* najviša koncentracija ukupnih fenola jeste kod biljaka raslih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 200 mM NaCl. Kod vrste *H. heimii* porastom koncentracije NaCl u podlozi raste koncentracija ukupnih fenola, a posebno na najvišim koncentracijama primenjene soli.

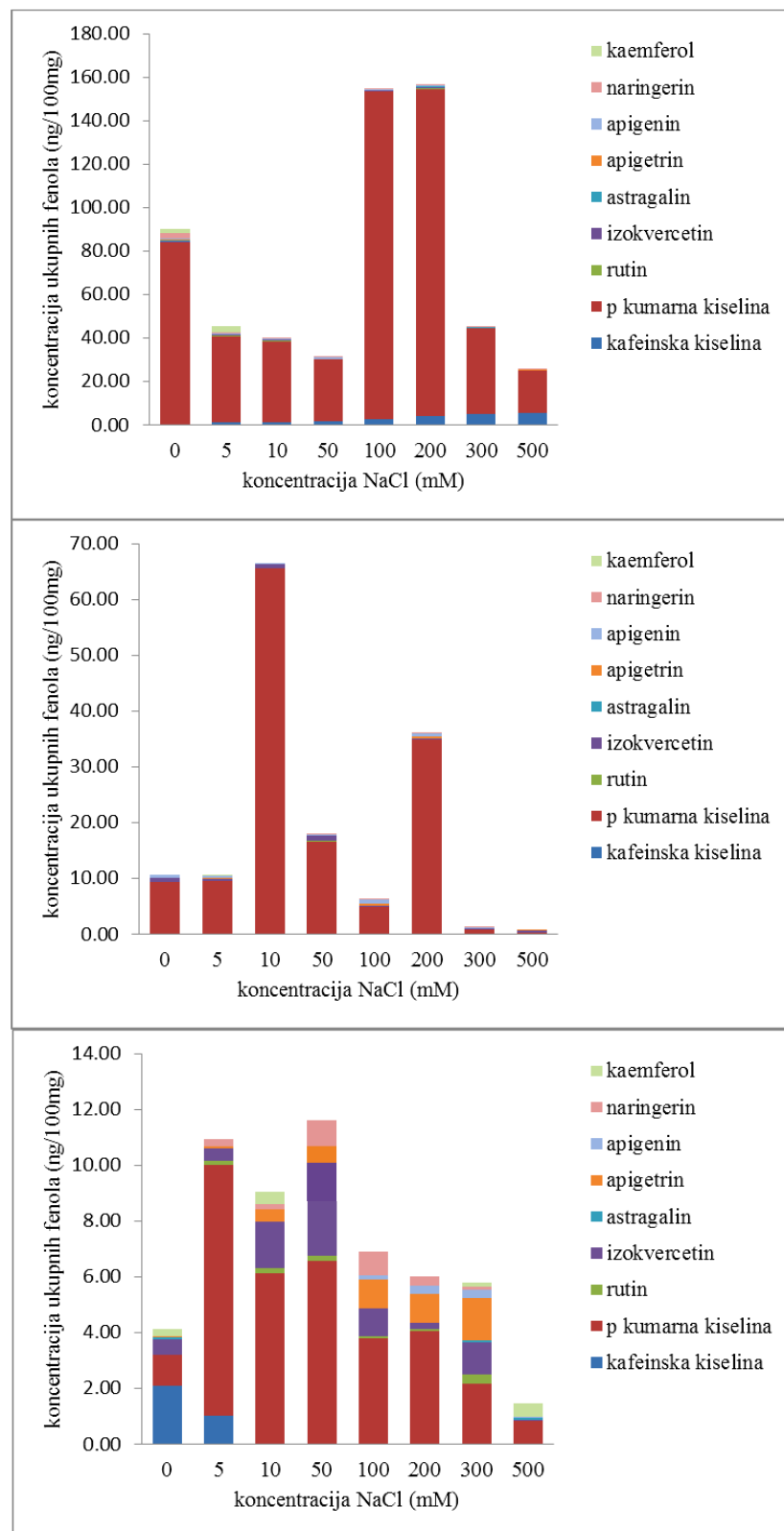
Kod biljaka izlaganih tri nedelje stresu solima uočava se da je prisutan manji broj fenolnih jedinjenja nego kod biljaka koje su gajene tri dana na medijumu sa dodatkom različitih koncentracija NaCl (grafik 29).

Kod sve tri ispitivane vrste dominantna kiselina je p kumarna kiselina, kao i kod biljaka izlaganih stresu solima tri dana. Najraznovrsniji sastav fenolnih jedinjenja zastupljen je kod vrste *H. heimii*. Vrsta *P. patens* najveći porast koncentracije fenolnih jedinjenja ima kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 100 i 200 mM NaCl. Koncentracija ukupnih fenola kod *E. hungaricus* pri dugotrajnom stresu solima je najviša kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 10 mM NaCl.

Za vrstu *H. heimii* je zapaženo da trend rasta/opadanja koncentracije fenola je različit kod biljaka gajenih na podlozi sa solima tokom tri dana i tokom tri nedelje. Kod biljaka gajenih tri dana na podlozi sa solima raste koncentracija ukupnih fenola, a kod biljaka gajenih tri nedelje na podlozi sa dodatkom NaCl koncentracija fotosintetičkih pigmenata opada.



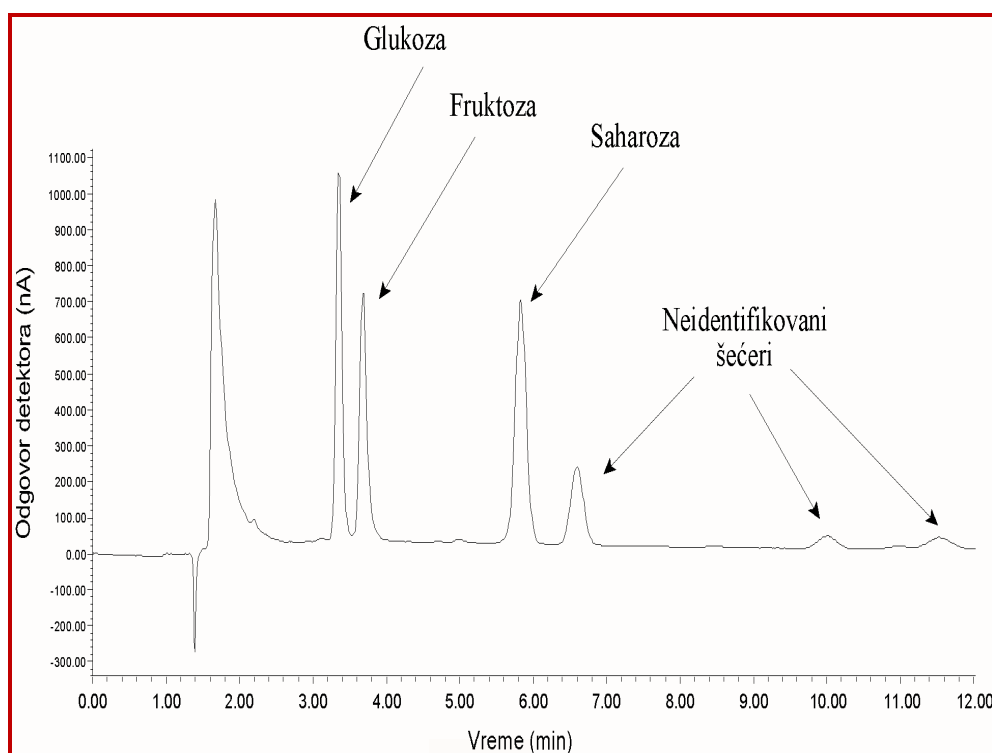
**Grafik 28.** Koncentracija ukupnih fenola kod vrsta *P. patens* (prvi grafik), *E. hungaricus* (grafik u sredini) i *H. heimii* (poslednji grafik) gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl



**Grafik 29.** Koncentracija ukupnih fenola kod vrsta *P. patens* (prvi grafik), *E. hungaricus* (grafik u sredini) i *H. heimii* (poslednji grafik) gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl

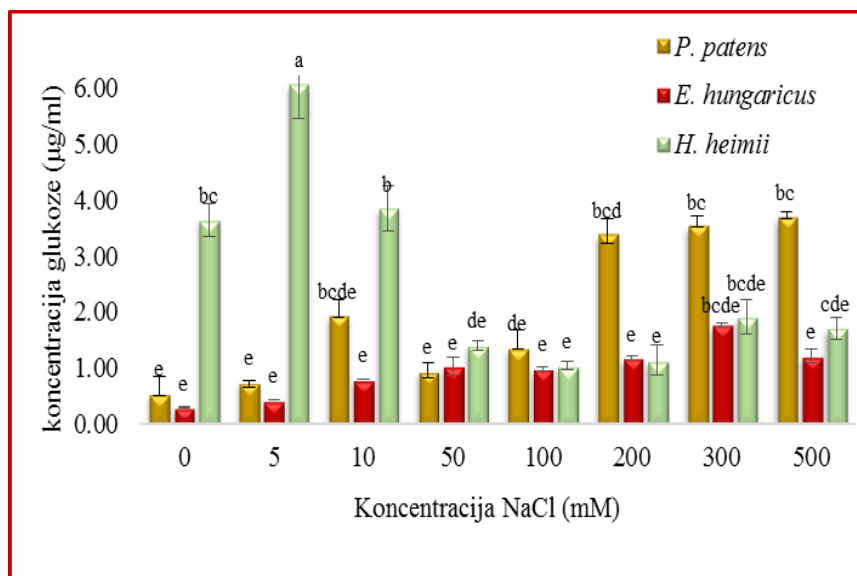
#### 4.9. Uticaj stresa solima na koncentraciju šećera mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u uslovima *in vitro*

HPLC - PAD analizom je pokazano prisustvo glukoze, fruktoze i saharoze kao dominantnih oblika šećera kod sve tri ispitivane vrste kako pri kratkotrajnom tako i prilikom dugotrajnog izlaganja biljaka stresu solima (slika 27). Pored navedenih šećera, postoje i šećeri koji nisu identifikovani primenjenom analitičkom metodom, a čiji se pikovi mogu uočiti na histogramu.



**Slika 27.** HPLC hromatogram, na kome su označeni pikovi identifikovanih šećera (glukoza, fruktoza i saharoza), kao i tri pika neidentifikovanih šećera

Količina identifikovanih šećera je varirala u zavisnosti od dužine trajanja stresa, kao i od intenziteta stresa. Ispitivanjem sadržaja šećera u biljkama tokom stresnih uslova, pokazano je da se u značajnim koncentracijama akumuliraju glukoza, saharoza i fruktoza. Oni predstavljaju uobičajene šećere koji se sintetišu i akumuliraju, kako u vaskularnim biljkama, tako i u briofitama (Sivakumar *et al.*, 2002; Couée, 2006; Yin *et al.*, 2010; Klavina, 2014). Na osnovu rezultata (grafik 30 i 31) uočava se prisustvo različite količine grukoze u zavisnosti da li su biljke izlagane tri dana ili tri nedelje stresu solima.



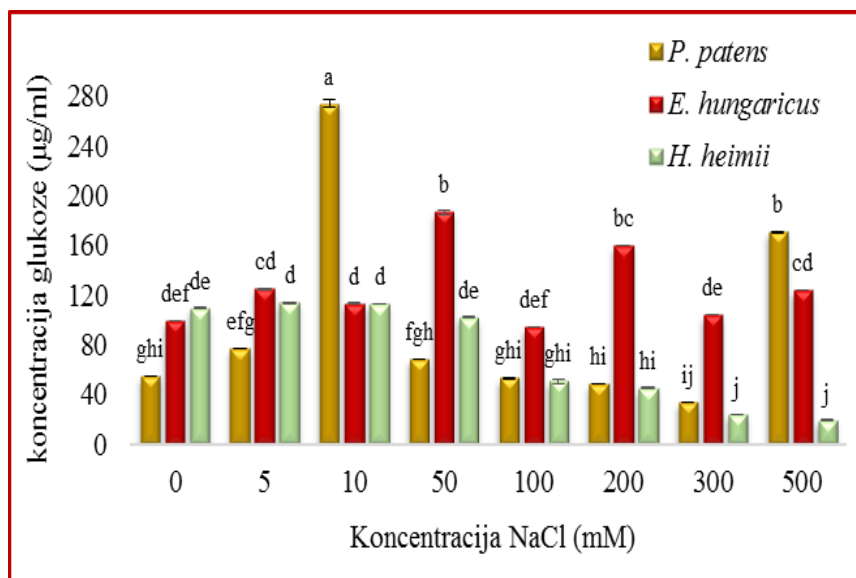
**Grafik 30.** Koncentracija glukoze kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu.)

Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da koncentracija glukoze kod vrste *P. patens* raste na najvišim koncentracijama soli od 200-500 mM NaCl i da je to povećanje statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu biljaka. Vrednost na najvišoj koncentraciji soli iznosi 3,8  $\mu\text{g/ml}$ . Kod vrste *H. heimii* je uočen drugačiji trend, gde je na niskim koncentracijama soli od 0–10 mM NaCl detektovana najviša količina glukoze, a da daljim povećanjem koncentracije soli dolazi do statistički značajnog opadanja vrednosti koncentracije ovog šećera. Kod vrste *E. hungaricus* koncentracija glukoze ima trend porasta koncentracije glukoze sa povećanjem koncentracije soli, ali taj porast količine šećera nije statistički značajan.

Na osnovu ANOVA analize, vrsta ispitivane mahovine ima statistički važniji uticaj na koncentraciju glukoze u biljkama u odnosu na primenjenu koncentraciju soli.

Kod biljaka izlaganih dugotrajnom stresu solima količina glukoze je znatno veća u poređenju sa biljkama koje su izlagane kratkotrajnom stresu solima.



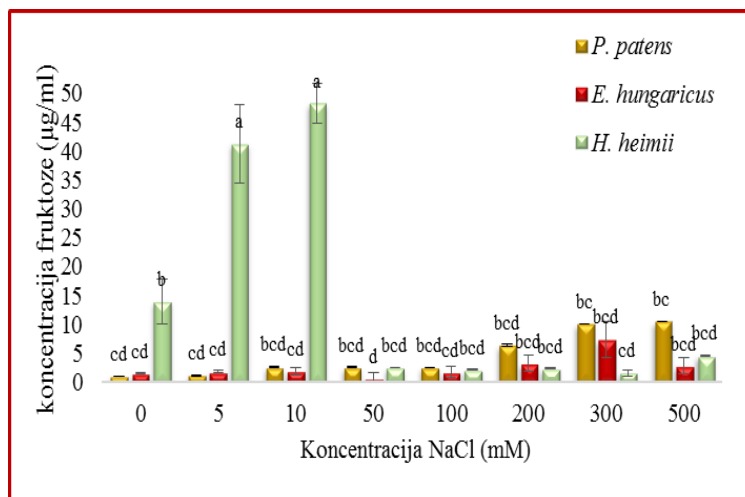


**Grafik 31.** Koncentracija glukoze kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu.)

Kod vrste *P. patens* se uočava da je najviša koncentracija glukoze prisutna na koncentraciji soli od 10 mM NaCl (260 µg/ml), a da daljim povećanjem koncentracije soli sadržaj glukoze opada sve 500 mM NaCl, kada ponovo dolazi do statistički značajnog porasta količine ovog šećera. Kod vrste *H. heimii* uočen je trend linearnog opadanja koncentracije glukoze na koncentracijama NaCl od 50 mM. Količina glukoze kod vrste *E. hungaricus* varira, a najviša koncentracija je zabeležena na tretmanu sa 50 mM NaCl (176 µg/ml).

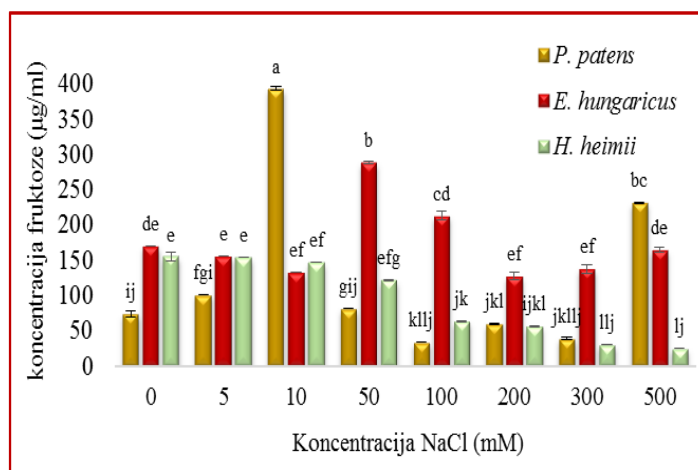
Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 32 i 33) koncentracija fruktoze varira u zavisnosti od ispitivane vrste, koncentracije NaCl u hranljivoj podlozi i od dužine trajanja stresa. Na osnovu ANOVA analize kod biljaka izlaganih kratkotrajnom stresu vrsta mahovine ima presudan značaj na sadržaj fruktoze, dok kod biljaka izlaganih dugotrajnom stresu koncentracija soli ima presudan značaj za sadržaj fruktoze.





**Grafik 32.** Koncentracija fruktoze kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu.)

Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 32) može se uočiti da je koncentracija fruktoze relativno niska za sve tri ispitivane vrste koje su izlagane kratkotrajnom stresu, sa izuzetkom vrste *H. heimii* gajenim u prisustvu niskih koncentracija soli od 0 do 10 mM NaCl uočava statistički značajno viša količina ovog šećera. Vrednost koncentracije fruktoze kod vrsta *P. patens* i *E. hungaricus* izlaganih tri dana stresu solima ima trend linearnog povećanja sadržaja fruktoze, sa porastom koncentracije NaCl, ali to povećanje nije statistički značajno.

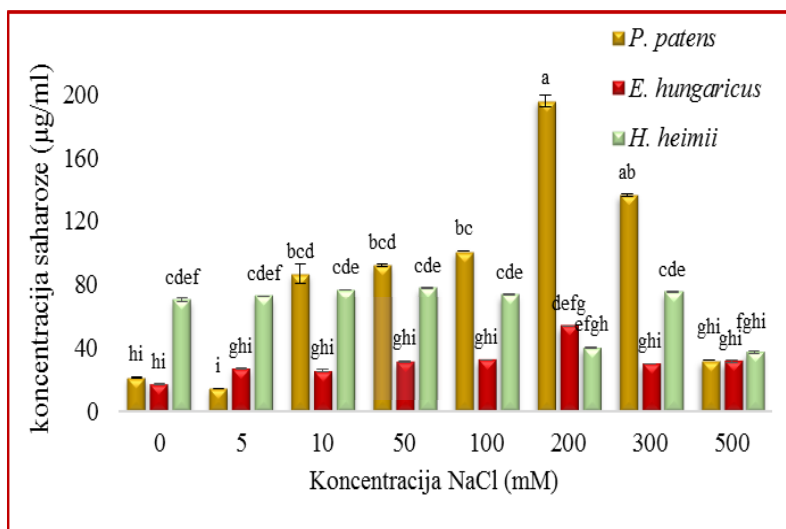


**Grafik 33.** Koncentracija fruktoze kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu.)

Koncentracija fruktoze je, kao i koncentracija glukoze, statistički značajno viša kod biljaka koje su izlagane dugotrajnom stresu solima u poređenju sa biljkama izlaganim kratkom stresu. Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 32 i 33), može se uočiti da postoji isti trend promene vrednosti glukoze i fruktoze kod biljaka koje su izlagane tri nedelje stresu solima, ali da je generalno koncentracija fruktoze viša od koncentracije glukoze.

Kod vrste *P. patens* je zabeležen najveći sadržaj fruktoze na koncentraciji od 10 mM NaCl (385 µg/ml), a takav trend ova vrsta pokazuje i za parametar kao što je koncentracija glukoze. Za vrstu *H. heimii* karakteristično je opadanje vrednosti koncentracije fruktoze sa povećanjem koncentracije soli.

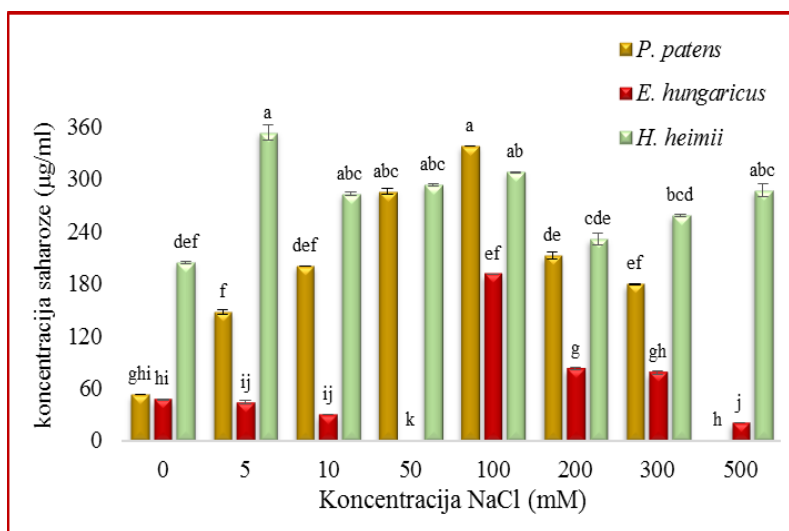
Koncentracija saharoze je viša kod biljaka izlaganih tri nedelje stresu solima nego kod biljaka izlaganih tri dana stresu solima (grafik 34 i 35). Na osnovu ANOVA analize pokazano je da koncentracija soli u hranljivoj podlozi predstavlja faktor koji najznačajnije utiče na količinu saharoze u biljci.



**Grafik 34.** Koncentracija saharoze kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu.)

Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 35) uočava se da kod vrste *P. patens* povećanjem koncentracije soli do 200 mM NaCl dolazi do porasta koncentracije saharoze u biljkama, a da dalji porast koncetracije soli dovodi do linearnog opadanja vrednosti koncentracija saharoze koje je statistički značajno.

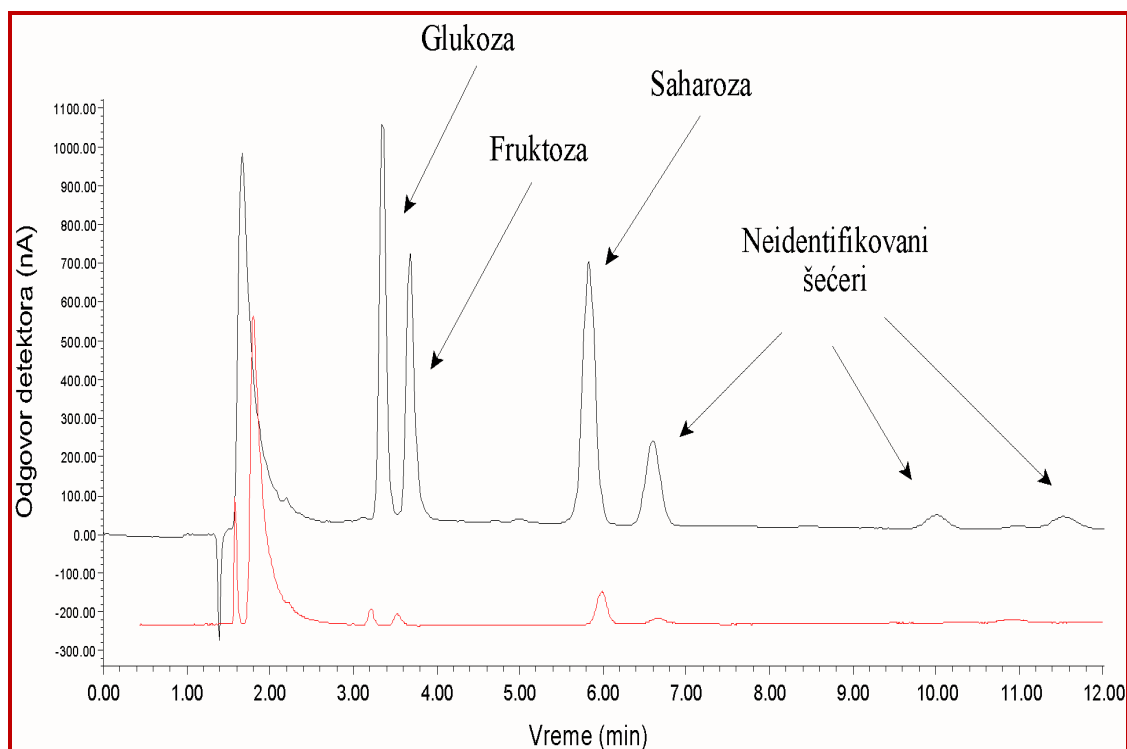
Kod vrste *E. hungaricus* porastom koncetracije soli takođe dolazi do linearnog porasta koncetracije saharoze, ali taj porast nije statistički značajan. Vrsta *H. heimii* ima približno iste vrednosti saharoze pri koncentraciji soli od 0-100 mM NaCl.



**Grafik 35.** Količina saharoze kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu.)

Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 35) uočava se da sa povećanjem koncetracije NaCl dolazi do linearnog porasta koncentracije saharoze kod vrste *P. patens*, izlagane tri nedelje stresu solima. Na najvišoj koncentraciji soli od 500 mM, nije detektovana saharoza kod vrste *P. patens*. Kod vrste *E. hungaricus* uočava se opadanje koncentracije saharoze na niskim koncentracijama NaCl, pri čemu saharoza nije detektovana u biljkama raslim na hranljivoj podlozi sa 50 mM NaCl. Na koncetraciji od 100 mM NaCl, zabeležena je najveća koncentracija saharoze za vrstu *E. hungaricus* (180 µg/ml), a povećanje koncetracije soli od 200 do 500 mM NaCl dovodi do linearnog opadanja koncentracije saharoze. Kod vrste *H. heimii* zabeležena je najveća koncentracija saharoze kod biljaka gajenih na medijumu sa dodatkom 5 mM NaCl.

Generalno, koncentracija šećera je značajno viša kod biljaka koje su izlagane dugotrajnom stresu u odnosu na biljke koje su izlagane kratkotrajnom stresu (slika 28). Ovakav trend može se objasniti ulogom šećera u osmotskom podešavanju. Na histogramu (slika 28) su prikazani preklopljeni HPLC - PAD hromatogrami ekstrakata biljaka *H. heimii* izlaganih dugotrajnom stresu solima (crna linija na hromatogramu) i kratkotrajnom stresu (crvena linija na hromatogramu).



**Grafik 28.** HPLC - PAD hromatogrami vrste *H. heimii* izlagane stresu solima tokom tri dana i tokom tri nedelje. (Crna linija na hromatogramu označava dugotrajni stres, dok crvena linija na hromatogramu označava kratak stres.)

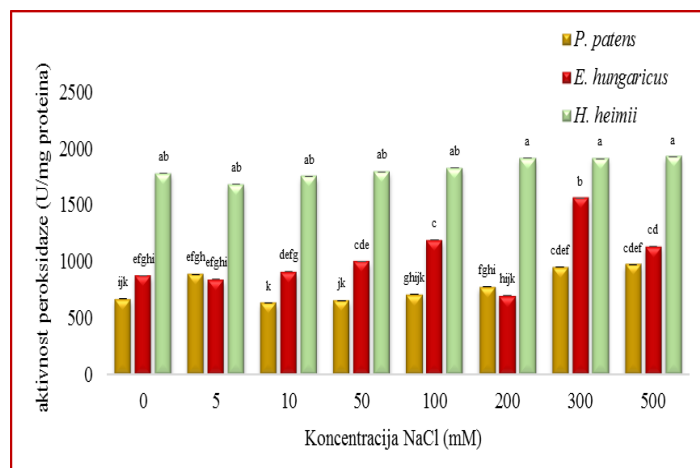
#### **4.10. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza kod mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u uslovima *in vitro***

Antioksidativni enzimi imaju veoma važnu ulogu u odbrani biljaka od abiotičkog i biotičkog stresa. Enzimi kao što su peroksidaze, katalaze i superoksid dismutase štite biljnu ćeliju od oksidativnog stresa i na taj način sprečavaju nagomilavanje štetnih ROS formi. Pojavom stresnih uslova dolazi do promene aktivnosti antioksidativnih enzima u cilju zaštite i očuvanja fizioloških procesa u biljnoj ćeliji.

##### **4.10.1. Spektrofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih peroksidaza**

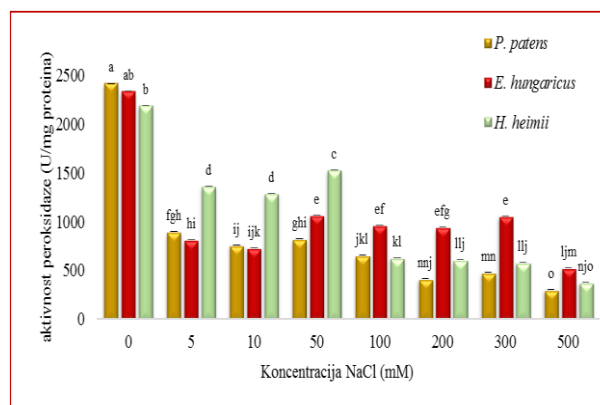
Aktivnost ukupnih peroksidaza se značajno razlikovala u zavisnosti od dužine vremenskog perioda u kome su biljke bile izložene stresu solima. Kod sve tri ispitivane vrste prilikom kratkotrajnog stresa solima, vrsta statistički najznačajnije utiče na aktivnost ukupnih peroksidaza, dok kod dugotrajnog izlaganja stresu statistički značaj ima primenjena koncentracija soli.

Kod biljaka *H. heimii* izlaganih tri dana stresu solima (Grafik 36) može se uočiti da nema statistički značajne promene aktivnosti ukupnih peroksidaza uslovljenih povećanjem koncentracija NaCl u hranljivoj podlozi (dobijene vrednosti kod svih uzoraka su oko 1800 U/mg proteina). Kod druge dve ispitivane vrste postoji trend porasta aktivnosti peroksidaza, koji nije statistički značajan, izuzev na 300 mM NaCl za vrstu *E. hungaricus* (izmerena aktivnost od 1560 U/mg proteina). Aktivnost ukupnih peroksidaza se statistički razlikuje između tri ispitivane vrste. Najveća peroksidazna aktivnost prisutna je kod vrste *H. heimii*, a najniža kod vrste *P. patens*, gde ne prelazi vrednost od 968 U/mg proteina.



**Grafik 36.** Ukupna aktivnost peroksidaza kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Kod biljaka izlaganih dugotrajnom stresu solima, uočava se pad vrednosti aktivnosti ukupnih peroksidaza, sa porastom koncentracije soli u hranljivoj podlozi. Vrednost aktivnosti ukupnih peroksidaza je najviša u kontrolnoj grupi biljaka kod sve tri ispitivane vrste (grafik 37). Na tretmanima sa niskom koncentracijom soli (5-50 mM NaCl) najveća aktivnost ukupnih peroksidaza je kod vrste *H. heimii*, dok je na većim koncentracijama soli (100-300 mM NaCl) najveća aktivnost ukupnih peroksidaza kod vrste *E. hungaricus*.

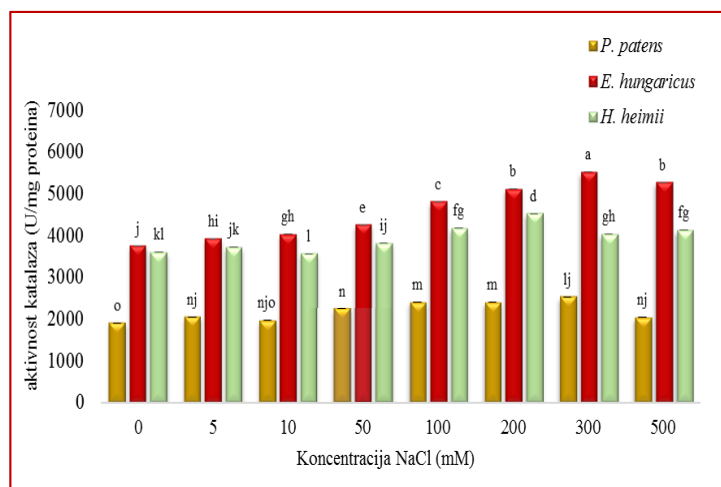


**Grafik 37.** Ukupna aktivnost peroksidaza kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

#### 4.10. 2. Spekrtofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih katalaza

Rezultati aktivnosti ukupnih katalaza kod ispitivanih vrsta mahovina pokazuju različit trend kod biljaka izlaganih kratkotrajnom i dugotrajnom stresu solima. Kao i kod aktivnosti ukupnih perokidaza i kod aktivnosti katalaza statistički najznačajniji uticaj na aktivnost kod kratkotrajnog stresa ima vrsta mahovine, a kod dugotrajnog stresa koncentracija primenjenog NaCl.

Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 38) kod biljaka izlaganih tri dana stresu solima uočava se sličan trend rasta vrednosti aktivnosti katalaza kod sve tri ispitivane vrste. Statističkom analizom i ANOVA testom potvrđeno je da faktor koji ima ključni uticaj na aktivnost katalaza prilikom kratkotrajng izlaganja solima je sama vrsta, a ne koncentracija primenjenog NaCl. Postoji razlika u aktivnosati između vrsta, ali nema značajne statističke razlike u aktivnosti katalaza kod biljaka gajenih na različitim koncentracijama soli u okviru iste vrste.



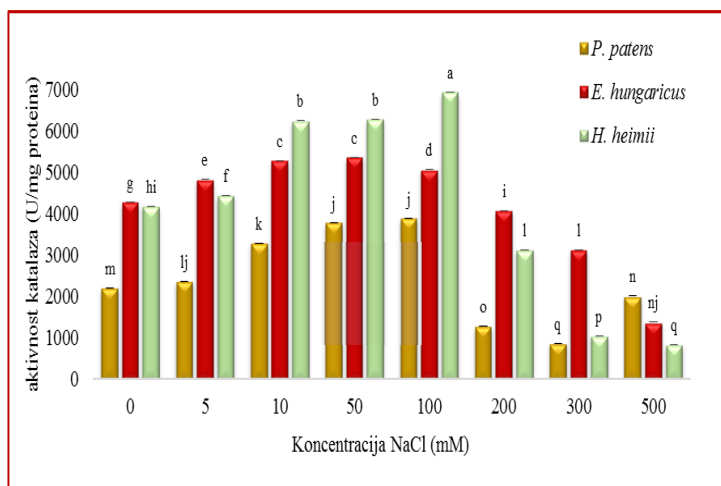
**Grafik 38.** Ukupna aktivnost katalaza kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu).

Kod biljaka izlaganih tri dana stresu solima zabeležena je najniža katalazna aktivnost kod vrste *P.patens* (1908 U/mg proteina), a najviša katalazna aktivnost uočena je kod vrste *E. hungaricus* (preko 5000 U/mg proteina) (grafik 38). Kod vrste

*E.hungaricus* na visokim koncentracijama soli dolazi do statistički značajnog porasta aktivnosti katalaza u odnosu na kontrolnu grupu biljaka.

Kod biljaka koje su izlagane stresu solima tokom tri nedelje (dugotrajni stres), uočava se drugačiji trend promene katalazne aktivnosti (grafik 39). Na osnovu statističke analize podataka i ANOVA testa utvrđeno je da presudan uticaj na vrednost aktivnosti katalaza u dugotrajnom stresu ima primenjena koncentracija soli.

Dugotrajan stres solima kod sve tri ispitivane vrste dovodi do porasta aktivnosti ukupnih katalaza na tretmanima sa 0-100 mM NaCl. Najviša katalazna aktivnost uočena je kod vrste *H. heimii* pri tretmanu solima u opsegu koncentracija od 10 do 100 mM NaCl (grafik 39). Porastom koncentracije soli iznad 100 mM NaCl dolazi do opadanja katalazne aktivnosti. Vrsta *P. patens* generalno pokazuje najnižu aktivnost katalaza na svim primenjenim koncentracijama soli (aktivnost u intervalu od 861-3881 U/mg proteina) u poređenju sa ostalim ispitivanim vrstama mahovina. Na najvišoj koncentraciji soli od 500 mM NaCl aktivnost katalaze je viša kod vrste *P. patens* u odnosu na druge dve ispitivane vrste.



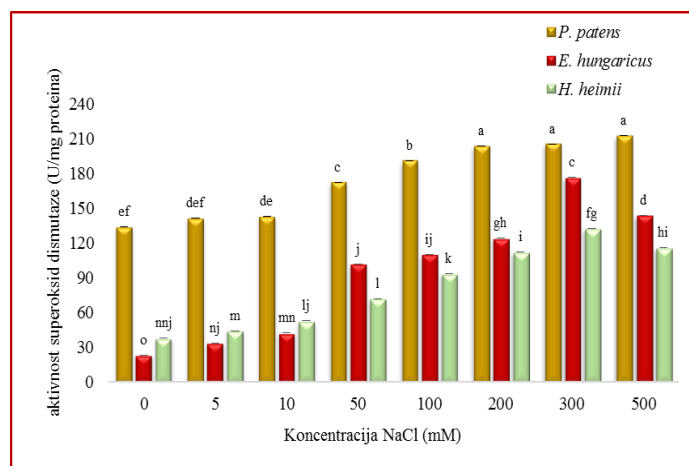
**Grafik 39.** Ukupna aktivnost katalaza kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu.)



#### 4.10. 3. Spekrtofotometrijska kvantifikacija aktivnosti ukupnih superoksid dismutaza

SOD aktivnost kod biljaka izlaganih tri dana stresu solima pokazuje trend porasta aktivnosti superoksid dismutase sa porastom koncentracije NaCl u hranljivoj podlozi, u slučaju svih ispitivanih vrsta (grafik 40). Najviša SOD aktivnost zabeležena je kod vrste *P. patens* i to kod biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom 500 mM NaCl (212.32 U/mg proteina). To je i najviša izmerena aktivnost SOD od svih uzoraka koji su analizirani nakon tri dana izlaganja biljaka stresu solima.

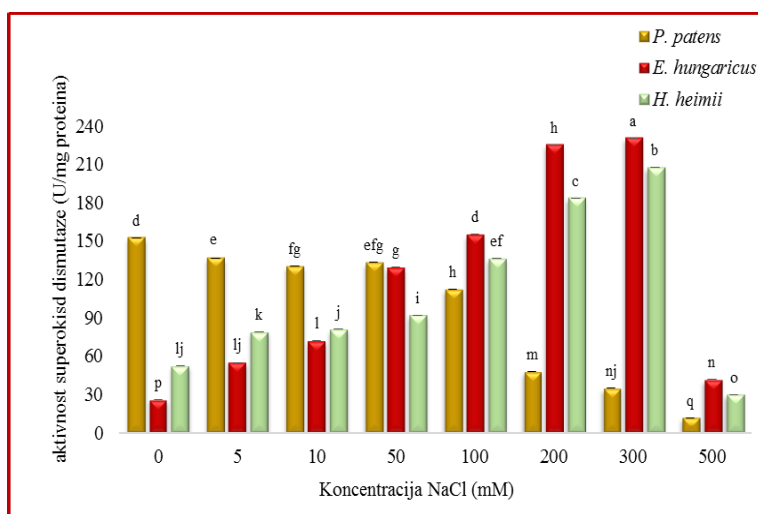
Statističkom analizom podataka i ANOVA testom potvrđeno je da na aktivnost SOD kod biljaka izlaganih kratkotrajnom stresu solima najveći uticaj ima vrsta, a da primenjena koncentracija soli u okviru iste vrste nema veliki statistički značaj.



**Grafik 40.** Ukupna aktivnost superoksid dismutaza kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri dana na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl- (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greška (n=3). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu.)

Kod biljaka izlaganih tri nedelje stresu solima uočava se da vrsta *P. patens* i vrste *E. hungaricus* i *H. heimii* imaju različit trend promene aktivnosti SOD. Kod vrste *P. patens* sa porastom koncentracije soli dolazi do opadanja aktivnosti SOD, koje je statistički značajno na visokim koncentracijama soli (200-500 mM NaCl). Kod vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* uočava se porast SOD aktivnosti povećanjem koncentracije

primenjenog NaCl do 300 mM. Opadanje SOD aktivnosti kod ove dve vrste zabeleženo je na najvišoj primenjenoj koncentraciji NaCl od 500 mM.

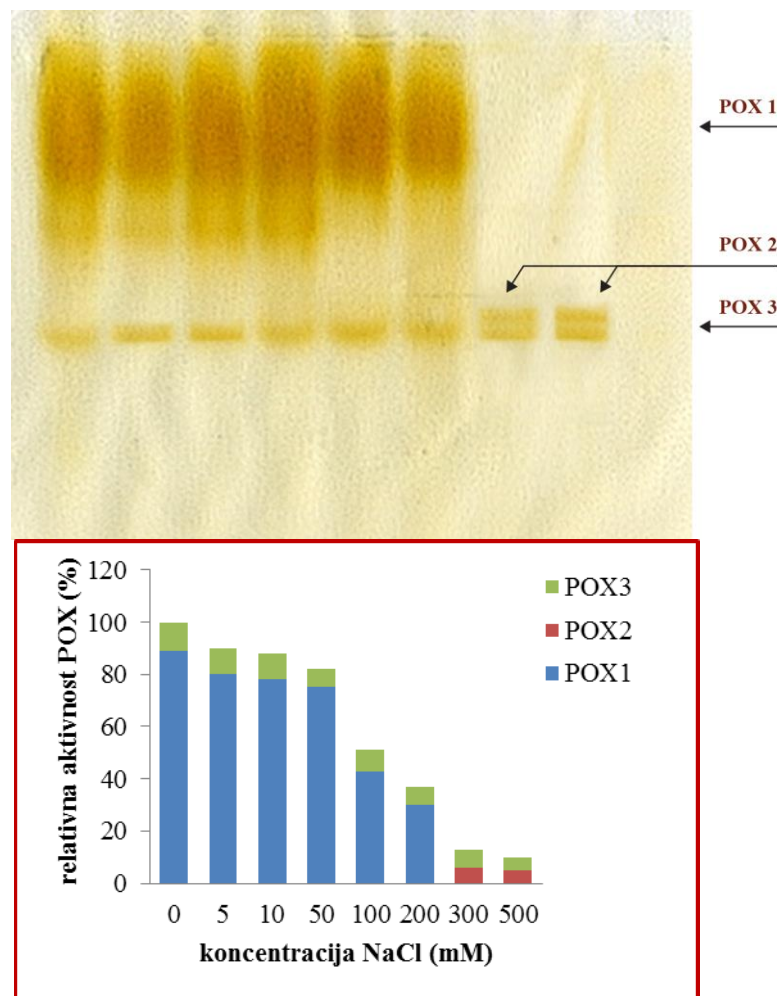


**Grafik 41.** Ukupna aktivnost superoksid dismutaze kod odabranih vrsta mahovina gajenih tri nedelje na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama NaCl. (Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta  $\pm$  standardna greska ( $n=3$ ). Vrednosti označene istim slovima ne pokazuju statistički značajnu razliku ( $p \leq 0.05$ ), prema Fisher's LSD testu.

#### 4.11. Detekcija aktivnosti peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza kod mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* izlaganih stresu solima u uslovima *in vitro*

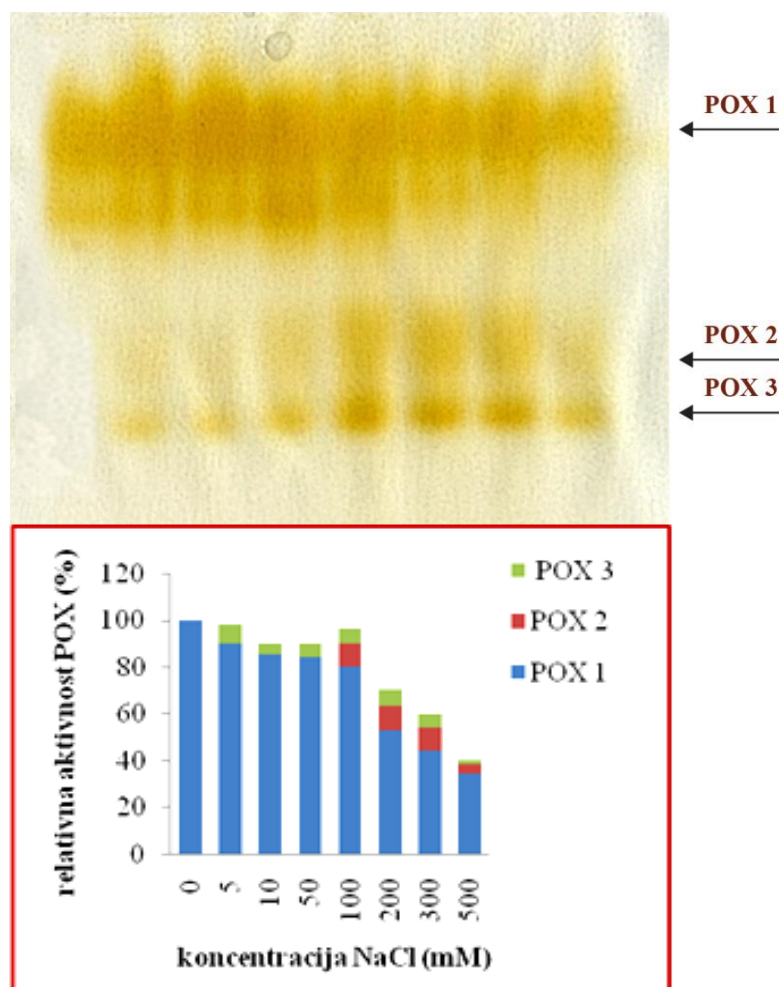
##### 4.11.1. Detekcija aktivnosti peroksidaza (POX) u gelu

Promene aktivnosti POX ispitivane su kod tri vrste mahovina koje su izlagane stresu solima tokom tri nedelje. Ukupni solubilni proteini razdvojeni su metodom native elektroforeze, a potom je izvršena detekcija peroksidaznih izoformi. Kao supstrat za detekciju izoformi peroksidaza korišćen je pirogalol.



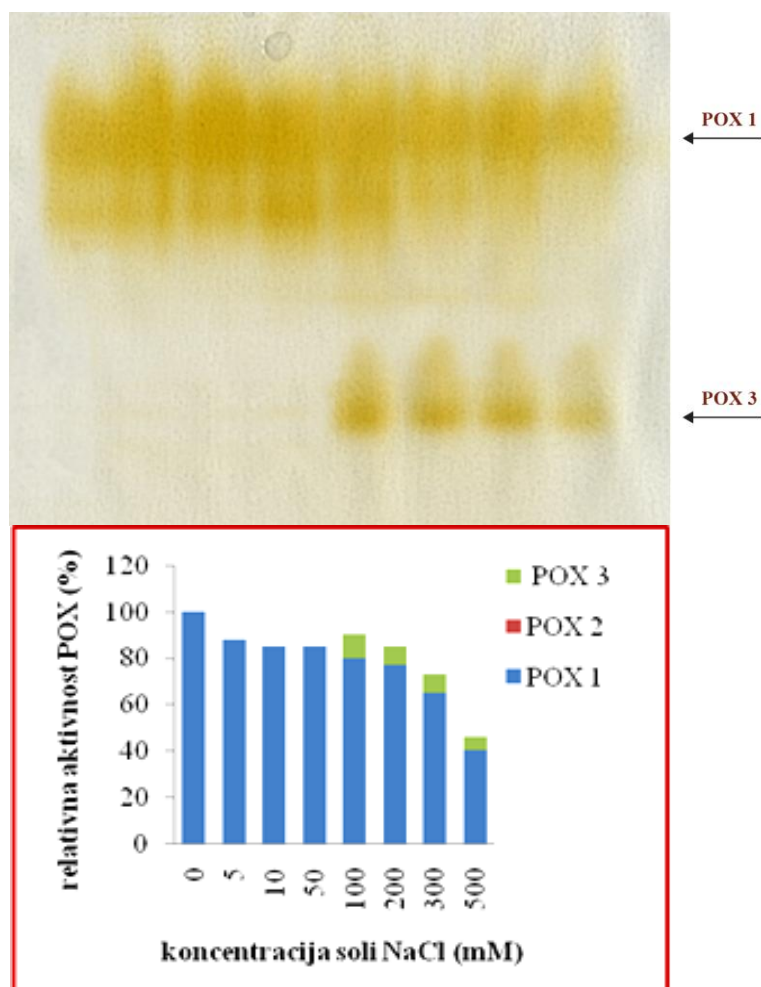
**Slika 29.** Analiza aktivnosti POX kod vrste *P. patens* izlagane dugotrajnom stresu solima. Aktivnost različitih izoformi određena je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje pirogalola kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta.

Relativna ukupna aktivnost peroksidaza u kontrolnoj grupi biljaka (gajenih na medijumu bez dodavanja soli) normalizovana je na 100%. Na osnovu elektroferograma uočava se da kod vrste *P. patens*, gajene tri nedelje na medijumu sa dodatkom različitih koncentracija soli, peroksidazna aktivnost opada porastom koncentracije NaCl (Slika 29). Najveća aktivnost POX kod ove vrste nakon tri nedelje stresa solima zabeležena je u kontrolnoj grupi biljaka. Kod kontrolne grupe biljaka, kao i na tretmanima sa NaCl u opsegu koncentracija od 5 do 200 mM NaCl uočava se prisustvo izoforme POX1, dok na najvišim koncentracijama NaCl ova izoforma nije prisutna. Izoforma POX 2, uočena je samo na koncentracijama NaCl od 300 i 500 mM. Na svim tretmanima, kako u kontroli, tako i na medijumu sa dodatkom NaCl uočava se izoforma POX 3.



**Slika 30.** Analiza aktivnosti POX kod vrste *E.hungaricus* izlagane dugotrajnom stresu solima. Aktivnost različitih izoformi određena je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje pirogalola kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta.

Kada je u pitanju dokazivanje aktivnosti peroksidaza kod vrste *E. hungaricus*, uočava se da je na svim koncentracijama NaCl prisutna izoforma POX 1 (Slika 30). Aktivnost izoforme POX1 opada sa porastom koncentracije NaCl u hranljivoj podlozi. Kod biljaka gajenih na medijumu bez soli nisu konstaovane druge izoforme POX. Izoforma POX 2 uočava se kod biljaka koje su gajene na koncentracijama NaCl višim od 100 mM, dok je izoforma POX 3 prisutna kod svih biljaka gajenih na medijumu sa solima, izuzev kontrolne grupe biljaka. Na hranljivom medijumu gde su dodate niske koncentracije NaCl (5-50 mM), uočava se da je aktivnost izofirme POX 3 niža u odnosu na biljke gajene na medijumu gde su dodate visoke koncentracije NaCl (100-300 mM NaCl).

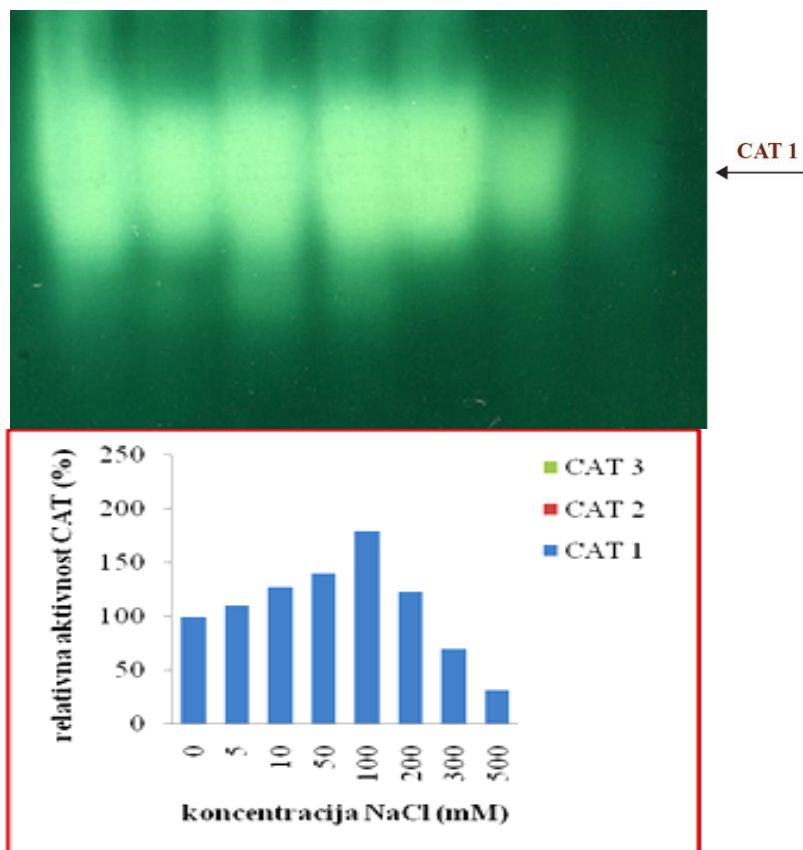


**Slika 31.** Analiza aktivnosti POX kod vrste *H.heimii* izlagane dugotrajnom stresu solima. Aktivnost različitih izoformi određena je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje pirogalola kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta.

Vrsta *H. heimii* ima drugačiji profil izoformi peroksidaza u odnosu na druge ispitivane vrste (Slike 29, 30 i 31). Kod ove vrste nije uočeno prisustvo POX 2 izoforme ni u kontrolnoj grupi biljaka, a ni kod biljaka tretiranih NaCl. Vrednost aktivnosti izoforme POX 1 najveća je kod kontrolne grupe biljaka, a opada sa porastom koncentracije NaCl. Kod vrste *H. heimii* na visokim koncentracijama soli, od 100 do 500 mM NaCl, detektovana je izoforma POX 3, koja je karakteristična za sve tretmane kod vrste *P. patens* i za biljke *E. hungaricus* gajene na visokim koncentracijama soli. POX 3 izoforma ima isti trend aktivnosti kod vrsta *H. heimii* i *E. hungaricus*.

#### 4. 11.2. Detekcija aktivnosti katalaza (CAT) u gelu

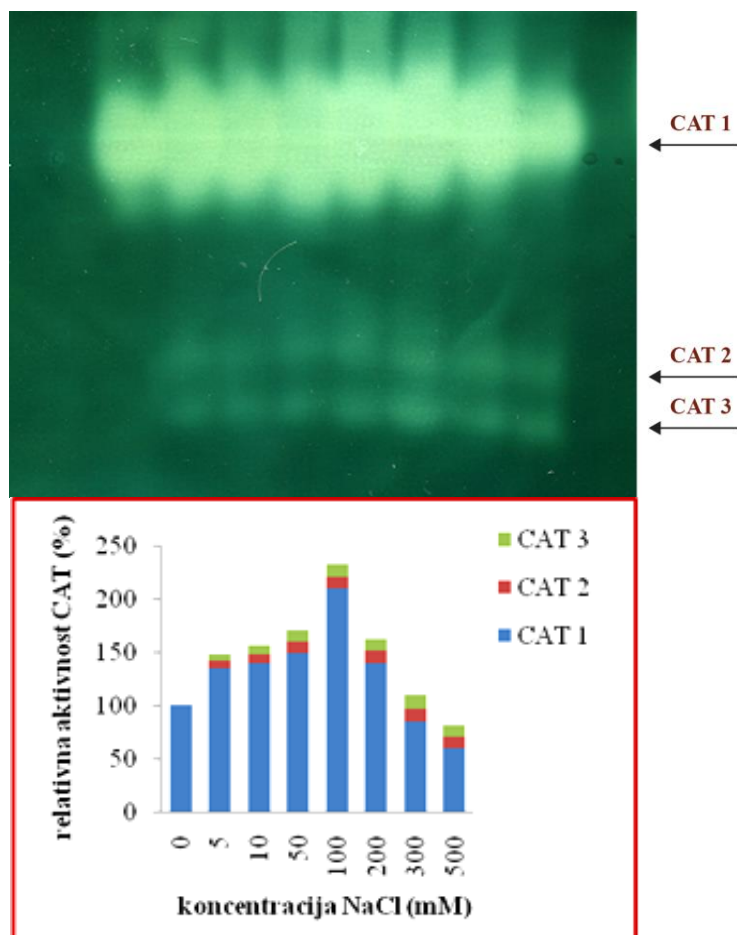
Promena aktivnosti CAT praćena je kod tri vrste mahovina koje su izlagane dugotrajnom stresu solima. Ukupni solubilni proteini razdvojeni su metodom native elektroforeze, a potom je izvršena detekcija katalaznih izoformi.



**Slika 32.** Analiza aktivnosti CAT kod vrste *P. patens* izlagane dugotrajnom stresu solima. Aktivnost različitih izoformi određena je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje  $K_3Fe(CN)_6$  i  $FeCl_3$  kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta.

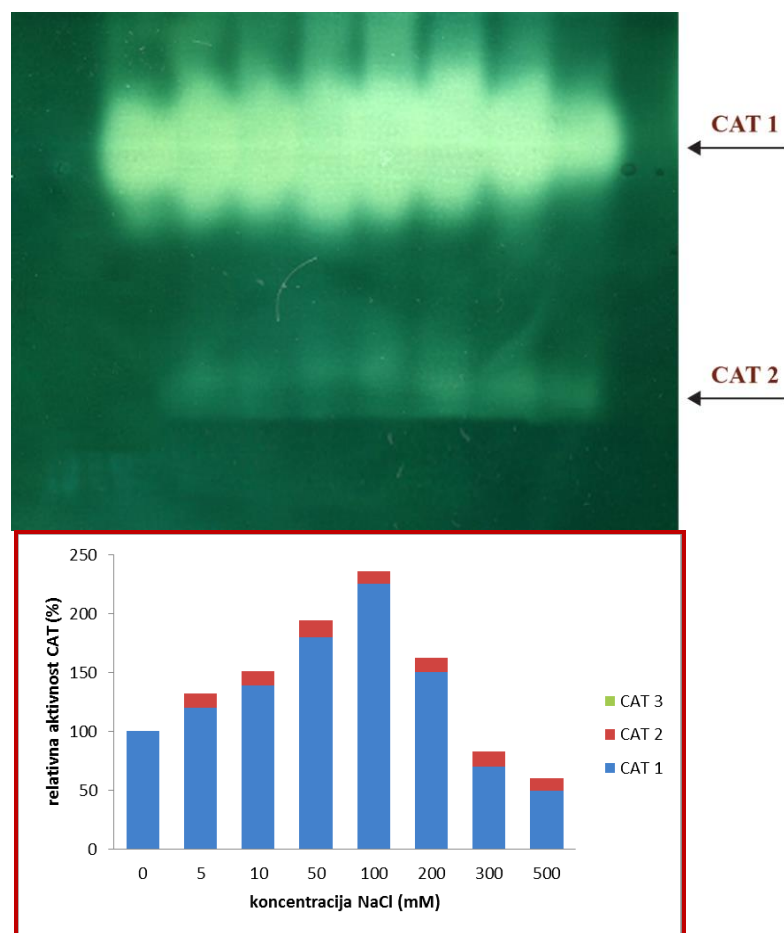
Kod vrste *P. patens* detektovana je jedna izoforma katalaze – CAT 1 (Slika 32). Prisustvo ove izoforme zabeleženo je i u kontrolnoj grupi biljaka i kod biljaka koje su bile na medijumu sa različitim koncentracijama NaCl. Aktivnost izoforme CAT 1 kod ove vrste raste sa porastom koncentracije NaCl do 100 mM. Na koncentracijama višim od 200 mM NaCl aktivnost ove izoforme opada. Najviša detektovana aktivnost izoforme CAT 1 je na koncentraciji soli od 100 mM NaCl.





**Slika 33.** Analiza aktivnosti CAT kod vrste *E.hungaricus* izlagane dugotrajnom stresu solima. Aktivnost različitih izoformi određena je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje  $K_3Fe(CN)_6$  i  $FeCl_3$  kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta.

Kod vrste *E. hungaricus* detektovano je prisustvo tri izoforme katalaza. Detektovane su izoforme: CAT 1, CAT 2 i CAT 3 (slika 33), pri čemu je aktivnost izoforme CAT 1 najviša kod biljaka na svim tretmanima. Kod kontrolne grupe biljaka nisu detektovane izoforme CAT 2 i CAT 3, već samo jedna izoforma katalaza, CAT 1. Vrednost aktivnosti izoformi katalaza raste na isti način kao i kod vrste *P. patens*. Porast je uočen povećanjem koncentracije NaCl do 100 mM, a daljim povećavanjem koncentracije soli aktivnost ovog enzima značajno opada. Vrednosti aktivnosti izoformi CAT 2 i CAT 3 su slične kod svih ispitivanih uzoraka, i ne zavise od tretmana solima.



**Slika 34.** Analiza aktivnosti CAT kod vrste *H.heimii* izlagane dugotrajnom stresu solima. Aktivnost različitih izoformi određena je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje  $K_3Fe(CN)_6$  i  $FeCl_3$  kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta.

Kod vrste *H. heimii* detektovane su dve izoforme katalaza, CAT 1 i CAT 2 (Slika 34). Kao i kod druge dve ispitivane vrste i kod *H. heimii* najvišu aktivnost pokazuje izoforma CAT 1. Ukupna aktivnost CAT 1 izoformi raste sa porastom koncentracije natrijum hlorida do koncentracije od 100 mM. Koncentracije više od 200 mM NaCl dovode do opadanja aktivnosti izoforme CAT 1, ali i ukupne aktivnosti katalaza. Izoforma CAT 2 nije prisutna kod kontrolne grupe biljka sve tri ispitivane vrste, a njena aktivnost kod biljka gajenih na medijumu sa dodatkom NaCl se ne menja značajno sa povećanjem koncentracije natrijum hlorida.

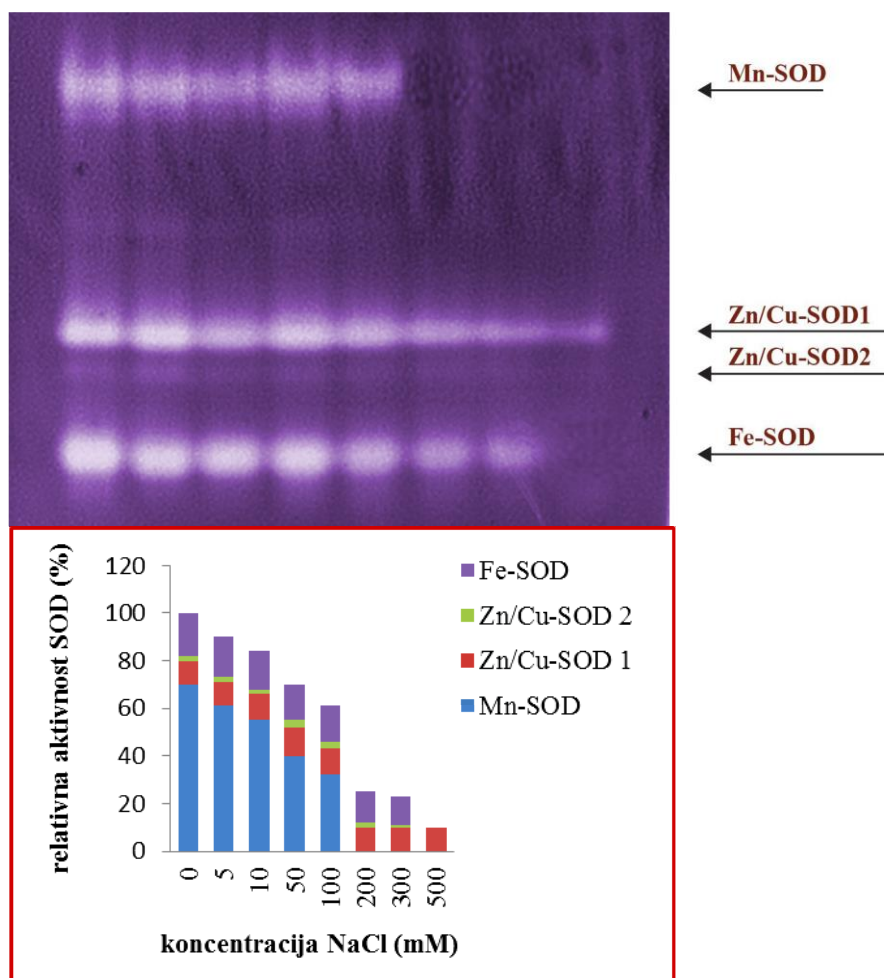
Na osnovu dobijenih rezultata za elektroforetsku detekciju katalaza, može se konstatovati da je dominantna izoforma CAT 1, koja je ujedno i jedina prisutna izoforma u kontrolnoj grupi biljaka kod sve tri ispitivane vrste mahovina.



#### 4. 11.3. Detekcija aktivnosti superoksid dismutaza (SOD) u gelu

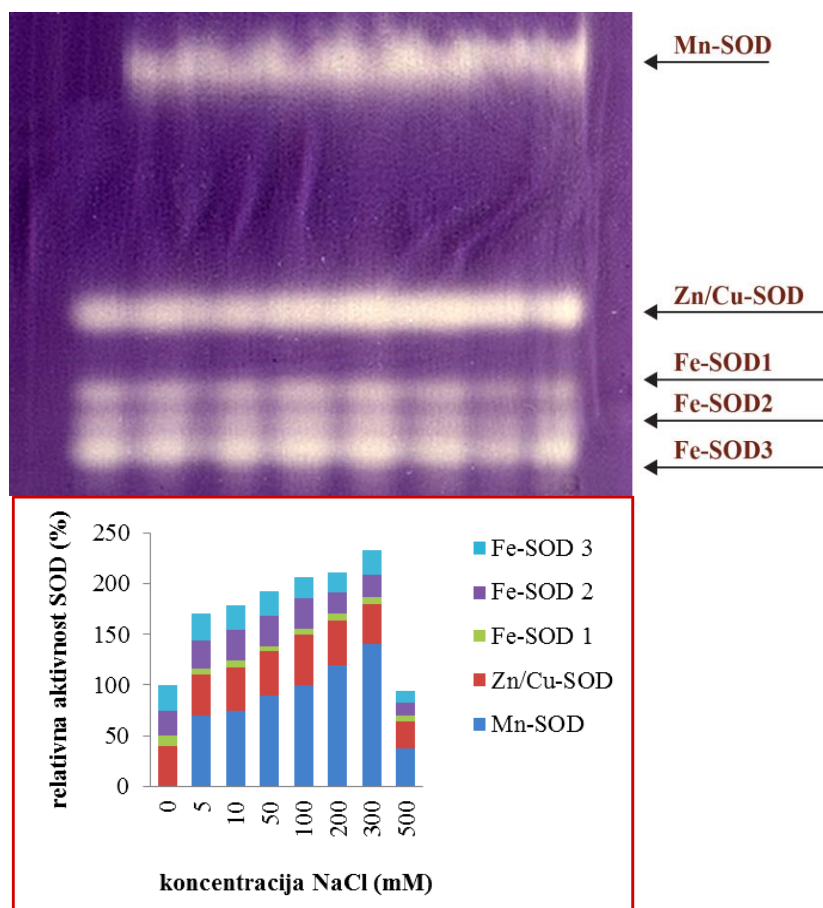
Aktivnost i zastupljenost ove grupe enzima analizirana je tokom tri nedelje gajenja tri vrste mahovina na medijumu koji je sadržao različite koncentracije NaCl. Aktivnost SOD izoformi je detektovana na gelu. Ukupni solubilni proteini iz ekstrakta testiranih biljaka razdvojeni su nativnom elektroforezom, a identifikacija pojedinih izoformi SOD izvršena je na osnovu njihove različite osetljivosti na dejstvo inhibitora KCN i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Na slici 35 prikazana je aktivnost izoformi SOD kod vrste *P. patens* gajene tri nedelje na medijumu sa dodatkom natrijum hlorida.



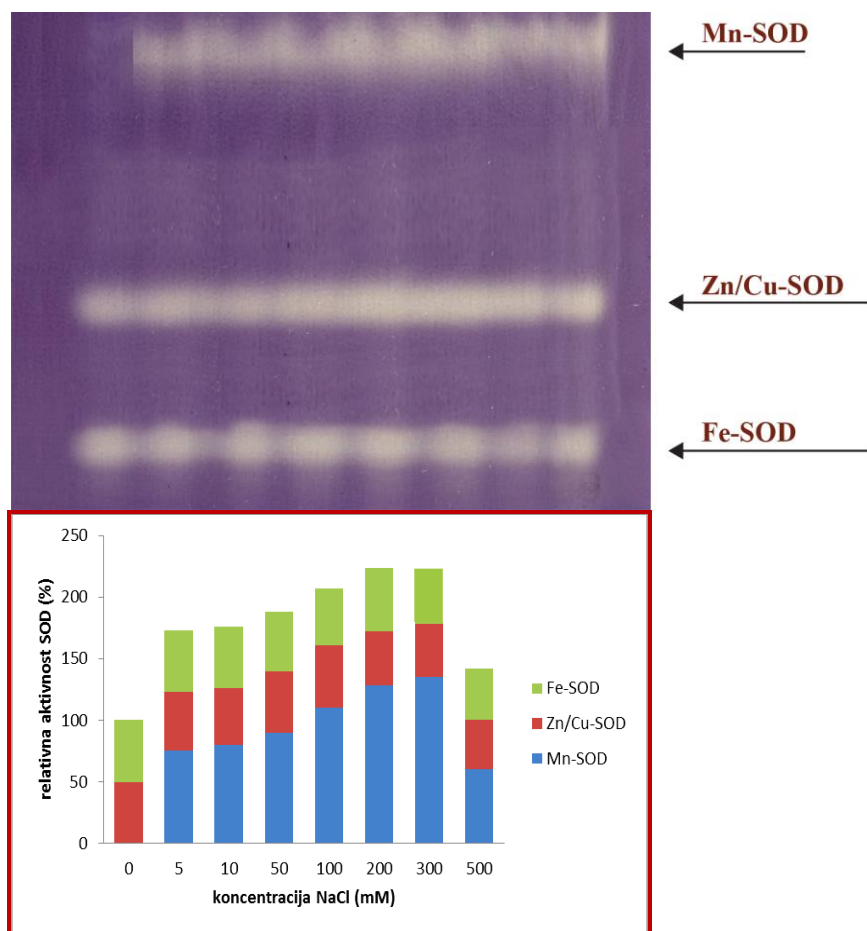
**Slika 35.** Analiza aktivnosti SOD kod vrste *P. patens* izlagane dugotrajnom stresu solima. Aktivnost različitih izoformi određena je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje NBT kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta.

Kada je u pitanju detekcija izoformi SOD, kod vrste *P. patens* uočeno je prisustvo Fe-SOD, Mn-SOD i Cu, Zn-SOD izoformi (Slika 35). Izoforma Mn-SOD se uočava kod kontrolne grupe biljaka i kod biljaka koje su gajene na medijumu sa NaCl u koncentracijama od 5 do 100 mM, dok na višim koncentracijama natrijum hlorida nije detektovana ova izoforma SOD. Kod kontrolne grupe biljaka detektovane su dve izoforme enzima Cu/Zn-SOD (od kojih Cu/Zn-SOD 1 izoforma ima izraženiju aktivnost u odnosu na Cu/Zn-SOD 2 izoformu) i Fe-SOD izoforma. Fe-SOD izoforma nije detektovana samo kod grupe biljaka koja je rasla na najvišoj koncentraciji soli od 500 mM. Ukupna relativna aktivnost SOD kod vrste *P. patens* opada sa porastom koncentracije natrijum hlorida. Na slici 36 prikazano je prisustvo različitih izoformi SOD kod vrste *E. hungaricus*, gajene tri nedelje na medijumu sa dodatkom NaCl.



**Slika 36.** Analiza aktivnosti SOD kod vrste *E.hungaricus* izlagane dugotrajnom stresu solima. Aktivnost različitih izoformi određena je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje NBT kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta.

Kod vrste *E. hungaricus* detektovane su tri različite izoforme SOD, Fe-SOD, Mn-SOD i Cu/Zn-SOD. Prisustvo Mn-SOD detektovano je kod svih uzoraka, izuzev kod kontrolne grupe biljaka. Prisustvo Cu/Zn-SOD izoforme zabeleženo je u obliku jedne izoforme i relativna aktivnost ove izoforme je sličana za sve uzorke, tj. ne menja se u zavisnosti od koncentracije soli. Prisustvo Fe-SOD izoforme zabeleženo je u vidu tri podforme ovog enzima (Fe-SOD 1, Fe-SOD 2, i Fe-SOD 3) (slika 36). Sa porastom koncentracije soli do 300 mM NaCl, dolazi do značajnog porasta relativne aktivnosti SOD kod vrste *E. hungaricus*. Na najvišoj primenjenoj koncentraciji od 500 mM NaCl vrednost relativne aktivnosti SOD značajno opada. Na slici 37 prikazano je prisustvo različitih izoformi SOD kod vrste *H. heimii*, gajene tri nedelje na medijumu sa dodatkom natrijum hlorida.



**Slika 37.** Analiza aktivnosti SOD kod vrste *H.heimii* izlagane dugotrajnom stresu solima. Aktivnost različitih izoformi određena je nakon elektroforetskog razdvajanja ukupnih proteina na akrilamidnim gelovima i bojenjem uz korišćenje NBT kao supstrata. Relativna aktivnost pojedinačnih izoformi, predstavljena na histogramu, određena je densitometrijskom kvantifikacijom. Stubići predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta.

Kod vrste *H. heimii* zabeležene su slične izoforme kao i kod vrste *E. hungaricus*. Relativna aktivnost enzima takođe ima isti trend kao i kod vrste *E. hungaricus*. Porastom koncentracije soli dolazi do povećanja relativne aktivnosti ovog enzima, sve do koncentracije od 300 mM NaCl. Jedina razlika u odnosu na vrstu *E. hungaricus* jeste da se javlja samo jedna forma Fe-SOD izoforme. Relativne aktivnosti Zn,Cu-SOD i Fe-SOD se ne menjaju značajno sa povećanjem koncentracije soli, dok su najveće promene izražene kod Mn-SOD izoforme. Mn-SOD izoforma nije uočena kod kontrolnih biljaka.



# *DISKUSIJA*



## 5. DISKUSIJA

### 5.1 Uspostavljanje *in vitro* kulture briofita

Metoda *in vitro* kulture biljnih ćelija i tkiva se već dugi niz godina koristi za ispitivanje procesa rastenja, razvića i diferencijacije mahovina (Sabovljević *et al.*, 2003, 2010, 2012a, 2014; Vujičić *et al.*, 2009, 2011, 2012, 2015).. Pored toga, primena mikropropagacije omogućava masovnu produkciju gametofita i protonema. Briofite su se pokazale kao odličan i vrlo povoljan materijal za kulturu *in vitro* i veoma su dobar eksperimentalni model za manipulaciju (Duckett *et al.*, 2004).

Jedan od najtežih koraka rada sa briofitama u kulturi *in vitro* je uspostavljanje aseptičnih kultura. Proces uspostavljanja kultura *in vitro* počinje od sterilizacije biljnog materijala koji se koristi kao početni materijal. Sterilizacija biljnog materijala pri uvođenju biljaka u kulturu *in vitro* je težak i dugotrajan proces iz više razloga. Osnovni razlozi za to jesu sama građa filoida, koji je građen iz jednog sloja ćelija, kao i odsustvo kutikule kao zaštitnog sloja. Uspostavljanje *in vitro* kultura vrsta koje su korišćene u ovom doktoratu (*E. hungaricus* i *H. heimii* koje su prvi put uvedene u kulturu *in vitro*), je vršeno na sličan način (kao početni materijal su korišćene spore) kao i za većinu drugih briofita koje postoje u kolekciji BBGB (eng., Bryophyte Biology Group Belgrade), koja trenutno broji blizu 200 vrsta sa pet kontinenata (Sabovljević *et al.*, 2003, 2010, 2012a, 2012b, 2014; Vujičić *et al.*, 2009, 2010, 2011, 2012, 2015). Vrsta *P. patens* je dobijena kao aseptična kultura, a korišćena je jer predstavlja model organizam u fiziologiji i molekularnoj biologiji biljaka.

Najuspešnijom se pokazala regeneracija iz spora, mada je moguće regenerisati biljke i od listastog gametofita (Sokal *et al.*, 1997; Sabovljević *et al.*, 2003; Rowntree, 2006). Poslednjih dvadeset godina intenzivirana su istraživanja koja se odnose na proučavanje razvića briofita, a koja se zasnivaju na primeni metoda molekularne biologije (Cove *et al.*, 1997; Reski, 1998a, 1998b, 1999; Schumacker & Dietrich, 1998). Kao osnova ovim istraživanjima služe podaci dobijeni tokom dugogodišnjih istraživanja fiziologije i morfogeneze briofita (Bartthelmess, 1940; Bopp 1953, 1954, 1955, 1959, 1963; Bauer & Mohr, 1959; Kofler, 1959; Mitra & Allsopp, 1959; Bauer, 1966; Brandes, 1967a, 1967b, 1967c; Sabovljević *et al.*, 2003, 2010, 2012a, 2012b, 2014; Cvetić *et al.*, 2005; Bogdanović *et al.*, 2009, 2011; Vujičić *et al.*, 2009, 2010, 2011,

2012, 2015). Najveći broj istraživanja bavio se ulogom auksina i citokinina u morfogenezi briofita.

## **5.2 Uticaj hormona (auksina i citokinina) na morfogenezu mahovina *E. hungaricus* i *H. heimii***

U poslednjih dvadeset godina postoji veliki broj radova koji se odnose na morfogenezu briofita u kulturi *in vitro*. U poređenju sa vaskularnim biljkama, ipak je mali broj eksperimenata do danas urađen na briofitama. Međutim, praćenje uticaja regulatora rastenja i razvića na morfogenezu briofita je postalo jako zanimljivo istraživačima, ne samo zato što one imaju jednostavnu strukturu, već zato što briofite odgovaraju na delovanje regulatora rastenja i razvića i sve testirane vrste ne reaguju na isti način (Von Schwartzenberg, 2009). Na proces rastenja i razvića gametofita u kulturi *in vitro* bitnu ulogu imaju biljni hormoni, a pre svega auksini i citokinini. Formiranje gametofita u kulturi *in vitro* je proces koji, u velikoj meri, zavisi od vrste briofita i uslova pod kojim one rastu. Neke vrste odlikuje kratak životni ciklus i visok stepen formiranja gametofita. Kod istraživanih vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*, znatno veći stepen formiranja gametofita je kod vrste *E. hungaricus*.

Pojedine vrste briofita nakon uspostavljanja *in vitro* kulture spontano mogu proizvoditi veliki broj izdanaka (*P. patens*), dok druge vrste zahtevaju kombinaciju različitih koncentracija auksina i citokinina, koje bi dovele do multiplikacije pupoljaka ili inicirali prelazak iz faze protoneme u izdanak. Veliki broj radova se bavi ulogom auksina i citokinina, esencijalnih hormona briofita, kao i sinergističkim/antagonističkim dejstvom tokom uspostavljanja gametofita u kulturi *in vitro* (Sabovljević *et al.*, 2014).

Ove dve grupe biljnih hormona su i najviše proučavane kod briofita u odnosu na druge grupe fitohormona (Cove & Ashton, 1984). Odnos auksina i citokinina ima veoma važnu ulogu prilikom indukcije pupoljaka iz protoneme u uslovima *in vitro* (Sabovljević *et al.*, 2010, 2014), što je pokazano i istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije.. Optimalan odnos hormona za proces multiplikacije i/ili razviće pupoljaka je različit u zavisnosti od ispitivane vrste. Tako su za regeneraciju velikog broja pupoljaka

kod vrste *E. hungaricus* odgovorne visoke koncentracije citokinina, dok kod vrste *H. heimii* visoke koncentracije citokinina inhibiraju razviće pupoljaka.

Poznato je da je rani razvoj briofita stimulisan auksinima i citokininima, pri čemu je neophodna svetlost koja deluje posredstvom fitohroma i kriptohroma (Reski, 1998a). Dokazano je da kinetin može da indukuje razviće pupoljaka na protonemi koja raste u uslovima niskog inteziteta svetlosti ukoliko je protonema prethodno bila izložena dejstvu auksina. Ako se protonema prvo izloži dejstvu kinetina, a zatim IAA, do indukcije pupoljaka neće doći. Istraživanja su pokazala da su auksini neophodni za prelazak hloroneme u kaulonemu, dok je razvoj pupoljaka moguć samo na kaulonemi (Bopp, 2000).

Formiranje pupoljaka, broj pupoljaka i njihov položaj duž kauloneme, kao i intezitet ćelijskih deoba u protonemi, regulišu citokinini (Szweykowska *et al.*, 1971). Citokinini su neophodni za proces formiranja pupoljaka koji se odvija samo u slučajevima kada su ovi hormoni prisutni u hranljivom medijumu. U prirodnim uslovima protonema mora da dostigne određenu veličinu da bi došlo do formiranja pupoljaka, što je povezano sa količinom citokinina koje sintetiše u različitim fazama razvića. Citokininska aktivnost je ograničena specifičnim morfogogenetskim promenama tokom razvoja protoneme i formiranja pupoljaka na određenim ćelijama kauloneme. Nekoliko sati nakon percepcije citokinina, odgovor ćelija se ogleda u njihovoj elongaciji i deobi, nakon čega dolazi i do indukcije pupoljaka. Međutim, citokinini ne deluju kao okidač (Ashton *et al.*, 1979), već je potrebno da budu prisutni u kritičnom periodu tokom koga je diferencijacija kauloneme stabilizovana (Brandes, 1973).

Formiranje pupoljaka takođe zavisi i od koncentracije auksina. Niske koncentracije stimulišu indukciju pupoljaka, a pri visokim koncentracijama auksini izazivaju inhibiciju formiranja pupoljaka, kao i dediferencijaciju primordija pupoljaka (Spicess *et al.*, 1973). Međutim, u ovom istraživanju je pokazano da visoke koncentracije IBA mogu stimulisati stvaranje pupoljaka kod vrste *H. heimii*.

U prilog dobijenim podacima koji se odnose na morfogenezu vrste *H. heimii* idu i rezultati dobijeni na vrsti *Bryum argenteum* (Sabovljević *et al.*, 2002) gde je praćeno delovanje auksina i citokinina na prečnik protoneme i indeks multiplikacije vrste *B.*



*argenteum*. Sva jedinjenja iz grupe auksina (IAA, IBA, NAA, 2,4-D) pri niskim koncentracijama su stimulatивно delovala na razviće protoneme, dok su citokinini (BAP, TDZ, KIN) pokazali inhibitorsni efekat. Indeks multiplikacije mahovine *B. argenteum* je bio veći kod biljaka koje su rasle na podlozi sa auksinima nego kod biljaka raslih na podlozi obogaćenoj citokininima (Sabovljević *et al.*, 2002).

Kumra (1985) je pokazao da ne samo citokinini, već i auksini (IAA, 2,4-D, NAA) u kratkom vremenskom periodu indukuju i povećavaju broj obrazovanih pupoljaka kod mahovine *Anisothecium molliculum*, dok kod vrste *Bryum atrovirens* ne dolazi do obrazovanja pupoljaka ukoliko hranljiva podloga ne sadrži auksine (Chopra & Vashistha, 1990). Kod mahovine *Plagiomnium cuspidatum* citokinini u interakciji sa auksinima inhibiraju obrazovanje pupoljaka (Knoop, 1984). Istraživanje morfogeneze fakultativnih halofita (*E. hungaricus* i *H. heimii*) značajno je doprinelo razumevanju uticaja auksina i citokinina na procese rastenja i razvića kod ove dve vrste.

### **5.3 Morfogeneza mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u uslovima stresa solima**

Najveći pad vrednosti preživljavanja biljaka kod sve tri vrste ispitivanih mahovina uočava se nakon tronedelnog izlaganja ekstremnim koncentracijama soli u hranljivoj podlozi sa 500 mM NaCl. Ovakav trend je u izvesnoj meri očekivan, s obzirom da su vrste *E. hungaricus* i *H. heimii* fakultativni halofiti i poseduju određene mehanizme tolerancije i adaptacije na stres izazvan solima, pa se mogu izboriti sa prisutnom povećane koncentracijom soli u podlozi do određene granice. Generalno, halofite mogu uspešno da rastu i da se razmnožavaju do 300 mM NaCl u podlozi (Tester & Davenport, 2003). Ipak, pokazano je da čak i koncentracije soli od 600 mM nemaju destruktivan efekat na morfologiju i metabolizam vrste *P. patens*, ako se biljke postepeno izlažu stresnim uslovima (Benito & Rodríguez-Navarro, 2003; Frank *et al.*, 2005).

Promene u broju novoformiranih izdanaka kod biljaka koje su izlagane dugotrajnom stresu su slične za sve tri ispitivane vrste. Na osnovu rezultata (grafik 6) uočavamo da niske koncentracije od 5 i 10 mM NaCl imaju stimulatoran efekat na

indeks multiplikacije, tj. pospešuju stvaranje novih pupoljaka. Ovakve promene se dešavaju verovatno usled toga što niske koncentracije soli predstavljaju blaži oblik stresa za biljke na kojima njihov metabolizam funkcioniše normalno, dok visoke koncentracije soli predstavljaju ozbiljniji stres koji dovodi do oštećenja mnogih ćelijskih struktura, tako da je i razviće novih filoida i kauloida onemogućeno (Bogdanović *et al.*, 2011). Pojava protoneme karakteristična je za niske koncentracije NaCl, dok na većim koncentracijama nema formiranja sekundarne protoneme. Ovakvi rezultati ukazuju na inhibitorni efekat visokih koncentracija soli na razviće sekundarne protoneme.

Ipak, iako pri najvišim koncentracijama NaCl (300 i 500 mM) indeks multiplikacije i prisustvo i prečnik protoneme drastično opadaju, ne može se govoriti o apsolutnom inhibitornom efektu ovih koncentracija soli na razviće biljaka, jer određen broj biljaka preživljava i na najvišim koncentracijama NaCl. Ako bi se biljke nakon perioda izlaganja visokim koncentracijama NaCl dalje gajile na medijumu bez soli, moguće je da bi došlo do njihovog oporavka. To bi značilo da određena vrsta poseduje reparacione mehanizme koji joj omogućavaju da preživi stresne uslove i da kasnije, sa prestankom delovanja stresogenog faktora, uspostavi normalno funkcionisanje metabolizma. Ipak, fakultativno halofitne vrste briofita mogu da žive na zaslanjenim podlogama, ali optimum za njihovo rastenje i razviće su površine bez prisustva soli ili one na kojima su soli prisutne u niskim koncentracijama, ili pak period godine kada se soli spiraju ili razblažuju – npr. kišna sezona (Sabovljević & Sabovljević, 2007). Stepem redukcije rasta i razvića zavisi od mnogih faktora, kao što su: koncentracija soli i vreme trajanja izlaganja biljke stresnim uslovima, kao i od samog genotipa vrste (Parida & Das, 2005; Munns & Tester, 2008).

Na osnovu morfo-genetski parametara može se uočiti da najveći stepen preživljavanja ima vrsta *P. patens*, a da regeneracija novih pupoljaka kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom soli ima isti trend kod sve tri ispitivane vrste. Niske koncentracije soli od 5 i 10 mM NaCl kod sve tri ispitivane vrste stimulišu multiplikaciju izdanaka.

#### 5.4 Uloga stresa solima na količinu fotosintetičkih pigmenata kod mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii*

Stres solima ima značajan uticaj na fotosintetički aparat biljaka pa se stoga retencija hlorofila može koristiti kao parametar kojim se opisuje tolerancija neke vrste na ovaj tip stresa (Parida & Das, 2005). Uopšteno, smanjenje sadržaja hlorofila u biljkama tokom delovanja stresa solima je karakteristika osetljivih vrsta (Delfine *et al.*, 1999) i zavisi, kao i parametri morfogeneze, od koncentracije soli, trajanja tretmana i biljne vrste koja se izlaže stresu. Kod tolerantnih vrsta na stres sadržaj hlorofila se ne menja drastično ili se u nekim slučajevima povećava sa porastom saliniteta (Mišić *et al.*, 2009).

Dobijeni rezultati idu u prilog činjenici da je bitna dužina izlaganja biljaka stresu solima, kao i primenjena koncentracija soli. Biljke koje su izlagane tri dana stresu solima, pokazuju porast količine ukupnih hlorofila na niskim koncentracijama soli, dok na visokim koncentracijama soli količina hlorofila opada. Kod biljaka izlaganih dugotrajnom stresu solima uočava se trend opadanja koncentracije ukupnih hlorofila, što je i očekivano, jer je vreme izlaganja stresu tri nedelje. Kod vrste *H. heimii*, koja predstavlja fakultativno halofitnu vrstu, uočeno je da se količina ukupnih hlorofila ne menja statistički značajno povećanjem koncentracije soli.

Kod sve tri ispitivane vrste uočeno je prisustvo pigmenata i na najvećoj primenjenoj koncentraciji soli od 500 mM NaCl. To ukazuje na mogućnost da bi sa uspostavljanjem optimalnih uslova za rastenje i razviće (kada bi biljke nakon izlaganja stresu bile premeštene na hranljivi medijum bez soli) kod ovih vrsta potencijalno može obnoviti fotosintetički aparat i dalje nesmetano vršiti proces fotosinteze. Ova činjenica je potvrđena kod vrsta *Atrichum undulatum* i *B. argenteum*, koje su na najvišim izlaganim koncentracijama soli zadržale određenu količinu hlorofila i procenat preživelih biljaka (Bogdanović *et al.*, 2011). Takođe Frank i saradnici (2005) su pokazali i da vrsta *P. patens* uspešno preživljava i da se obnavlja posle izlaganja koncentraciji soli od 500 mM NaCl i da ne dolazi do kompletne degradacije hlorofila, već samo do usporene sinteze ovog pigmenta. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na to da su primenjene koncentracije NaCl nepovoljne za analizirane vrste

mahovina, tj. da inhibiraju i/ili usporavaju morfogenetske i fiziološke procese, ali ne dovode do njihovog potpunog prestanka

Kod vaskularnih biljaka, gajenih u optimalnim uslovima, odnos hlorofila a/b je 3:1, a nešto niža vrednost je karakteristična za briofite. U ovom istraživanju, najniži zabeležen odnos hlorofila a i b je kod biljaka *H. heimii* izlaganih stresu solima tokom tri nedelje. Odstupanje od ovog odnosa ukazuje na prisustvo stresogenog faktora, u ovom slučaju NaCl. Smanjenje ovog odnosa može biti uzrokovano degradacijom hlorofila, koja nastaje usled oksidativnog stresa, i to pretežno hlorofila a, pošto je on osetljiviji na soli nego hlorofil b (Singh & Dunbey, 1995), zatim njihovom smanjenom sintezom ili promenama u tilakoidnim membranama, koje nastaju kao posledica nedostatka vode (Khaleghi *et al.*, 2012).

Intezivnija degradacija hlorofila a u poređenju sa hlorofilom b se odražava i na odnos hlorofila a/b tokom gajenja biljaka na visokim koncentracijama soli. Uopšteno, negativan efekat soli na sadržaj hlorofila pokazan je u različitim istraživanjima na vaskularnim biljkama (Jungklang *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2011; Miladinova *et al.*, 2013) i na nekim vrstama briofita (Frank *et al.*, 2005; Chaves *et al.*, 2009; Bogdanović *et al.*, 2011). Soli imaju, negativan uticaj na proces sinteze hlorofila.

Karotenoidi su značajna zaštitna komponenta biljaka, čija se sinteza aktivira u toku stresa i njihova koncentracija se povećava kod tolerantnih vrsta što je stres intezivniji. Sinteza karotenoida je proces koji je energetski znatno zahtevniji u odnosu na sintezu hlorofila, pa zato na niskim koncentracijama soli i ne dolazi do statistički značajnog povećanja sinteze karotenoida kao pomoćnih fotosintetičkih pigmenata. Rezultati ovog istraživanja idu u prilog ovoj tvrdnji, gde je trend porasta karotenoida na niskim koncentracijama NaCl sličan trendu porasta hlorofila. Neki rezultati dobijeni ispitivanjem stresa solima na vaskularnim biljkama (Amirjani, 2011) pokazuju da na nižim koncentracijama soli ne dolazi do značajnog povećanja koncentracije karotenoida. Mnogi literaturni podaci govore o povećanju sadržaja karotenoida u toku osmotskog stresa, što ima veliki značaj u uključivanje karotenoida u ksantofilni ciklus (Misra *et al.*, 2006; Borghesi *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2012). Značaj ksantofilnog ciklusa se ogleda u zaštiti hlorofila kao glavnih pigmenata i prebacivanju viška energije sa hlorofila na ksantofile.

U uslovima kontrolisanog intenziteta zračenja (osvetljenosti) ksantofilni ciklus može biti jedan od mehanizama tolerancije, a karotenoidi su značajni i u odbrani od stresa solima. Ipak, iako nema povećanja sadržaja ukupnih karotenoida, to ne mora da znači da je vrsta osetljiva na salinitet, već je moguće da takve vrste poseduju i aktiviraju neke druge mehanizme tolerancije i adaptacije na stres. Poznato je da stres solima dovodi do indukcije biosinteze ABA za koju su potrebni karotenoidi kao prekursori u mevalonatnom biosintetskom putu. ABA je bitan regulator razvića biljaka u stresnim uslovima, posebno pri nedostatku vode. Stoga, povećanje količine karotenoida na visokim koncentracijama soli može biti posledica stimulacije biosinteze ABA i obezbeđivanja potrebnih prekursorskih jedinjenja, ali se takođe može desiti usled sinergističkog delovanja karotenoida i fenolnih jedinjenja u otklanjanju slobodnih radikala nastalih u oksidativnom stresu (Lim *et al.*, 2012).

Na osnovu rezultata ove doktorske disertacije uočava se da koncentracija ukupnih karotenoida opada povećanjem koncentracije soli kod vrsta *P. patens* i *E. hungaricus*, dok je kod vrste *H. heimii* trend drugačiji. Kod vrste *H. heimii* na niskim koncentracijama soli opada koncentracija ukupnih karotenoida, a na tretmanima sa dodatkom soli od 50 do 200 mM NaCl, dolazi do statistički značajnog povećanja koncentracije ukupnih karotenoida. Kod biljaka izlaganih tri dana stresu solima na niskim koncentracijama od 5 i 10 mM NaCl raste koncentracija ukupnih karotenoida za vrste *P. patens* i *H. heimii*.

### **5.5. Neenzimske komponente odbrane ispitivanih vrsta briofita od stresa solima**

Balans koji se uspostavlja između produkcije ROS u oksidativnim procesima i antioksidativnog kapaciteta biljaka omogućava regulaciju nivoa proizvodnje ROS formi i na taj način štiti biljni sistem u stresnim uslovima. Kada se biljke nalaze u normalnim uslovima za nesmetano odvijanje fizioloških procesa, antioksidativni odbrambeni sistem obezbeđuje biljkama adekvatnu zaštitu od aktivnih vrsta kiseonika i slobodnih radikala koji nastaju (Asada & Takahashi, 1987). Reaktivne kiseonične vrste mogu biti i produkt metabolizma i u normalnim uslovima i njihovo formiranje je sastavni deo mnogih metaboličkih procesa koji se dešavaju u biljnoj ćeliji. Pojačana produkcija ROS tokom stresa dovodi do oštećenja ćelija, ali i do pokretanja zaštitnog odgovora biljaka jer ROS

mogu imati funkciju signalnih molekula. U skladu sa tim, biljke poseduju dobro razvijene odbrambene mehanizme od ROS, koji im omogućavaju da ograniče produkciju ovih reaktivnih molekula i/ili da obezbede njihovo efikasno uklanjanje iz biljne ćelije (Alcher *et al.*, 2010).

Najveći problem nastanka ROS, jeste hidroksil radikal koji je najreaktivnija kiseonična vrsta koja nastaje tokom oksidativnog stresa. U eliminaciji ovog radikala učestvuju samo neenzimske komponente odbrane biljaka od stresa (Wojtaszek, 1997). Biljke obično održavaju nivo ROS pod strogom kontrolom zahvaljujući produkciji neenzimskih komponenti odbrane od stresa, među kojima su najvažniji prolin, tokoferol, glutation i askorbat, kao i fenolna jedinjenja (Kuzniak & Urbanek, 2000).

Fenolna jedinjenja su u literaturi poznata kao inhibitori rastanja biljaka, koji mogu da utiču na ishranu biljaka i fotosintezu (Blum & Gerig, 2005), propustljivost ćelijske membrane (Baziramakenga *et al.*, 1995), sintezu proteina (Mersie & Singh, 1993), respiraciju (Penuelas *et al.*, 1996), enzimsku aktivnost (Rama Devi & Prasad, 1992), balans esencijalnih hormona (Holappa & Blum, 1991), vodni potencijal (Booker *et al.*, 1992).

Fenolna jedinjenja se sintetišu kao antioksidansi u odgovoru na oksidativni stres, koji nastaje kao posledica izlaganja biljaka povećanim koncentracijama soli. Zbog oštećenja elektron transportnog lanca dolazi do stvaranja slobodnih radikala. Uobičajeno je da tada dolazi do povećanja sadržaja ukupnih fenola u biljkama ali, sa druge strane, može doći do njihovog smanjenja. Vakuolarne peroksidaze smanjuju koncentraciju ukupnih fenola u uzorcima tako što ih koriste kao primarne donore elektrona (Sgherri *et al.*, 2003). Antioksidativna svojstva fenola se upravo pripisuju njihovoj sposobnosti da doniraju  $H^+$  ili elektrone enzimima i da na taj način deluju kao „skevendžeri” slobodnih radikala (Bogdanović *et al.*, 2011). Zastupljenost fenola i njihova uloga u zaštiti od oksidativnog stresa zavisi od osetljivosti date vrste, kao i datog biljnog organa ili tkiva u kojima se njihov sadržaj određuje (Kim *et al.*, 2008).

Na osnovu rezultata dobijenih proučavanjem uticaja osmotskog stresa na vaskularne biljke, poznato je da u toku delovanja abiotičkih i biotički stresora dolazi do sinteze sekundarnih metabolita, od kojih značajni deo čine fenolna jedinjenja. Posebno je izražena sinteza fenola na podlozi sa slabim do umerenim salinitetom, dok se na

visokim koncentracijama soli može primetiti znatni pad sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (Navarro *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2012; Rezazadeh *et al.*, 2012).

Fenolna jedinjenja poseduju značajna fiziološko-hemijska i biološka svojstva. Sintetišu se u biljkama putem šikiminske kiseline ili od fenilpropanoida. Njihova sinteza se aktivira endogeno u toku razvića, ali može biti pokrenuta i različitim egzogenim faktorima koji utiču na rastenje i razviće biljaka (Lim *et al.*, 2012). Fenolna jedinjenja poseduju značajna fiziološko-hemijska i biološka svojstva. Mogu delovati kao signalni molekuli i učestvuju generalno u zaštiti biljaka od patogena, UV zračenja i odgovorni su za rezistenciju na bolesti i/ili ukljanjanje slobodnih radikala iz ćelija, koji nastaju u toku oksidativnog stresa. Stoga je bitno pratiti sadržaj fenolnih jedinjenja, kao i kvantifikovati količinu tih jedinjenja u biljkama koje su izlagane stresu solima, jer dobijeni rezultati nam mogu ukazati na mehanizam tolerancije koji određena vrsta koristi u toku stresa.

Poznato je da briofite sintetišu veliki broj sekundarnih metabolita tokom odbrambenog odgovora na različite sredinske agense (Asakawa, 2007), a među njima značajnu ulogu imaju fenolna jedinjenja. Ispitivanjem sadržaja fenolnih kiselina i flavonoida u ovom istraživanju detektovano je prisustvo 9 različitih fenolnih jedinjenja kod sve tri ispitivane vrste. Detektovane su dve fenolne kiseline (kafaična i p-kumarna kiselina) i flavonoidi iz grupa flavona (apigenin i apigetrin), flavonola (rutin, izokvercitrin, astragalin i kaemferol), i flavanona (naringenin). Interesantno je to da je dominantno fenolno jedinjenje kod svih analiziranih vrsta p-kumarna kiselina koja je poznata kao efiksan skevendžer slobodnih radikala (Asakawa, 2007). Uočen je porast sadržaja ove fenolne kiseline kod *P. patens*, *H. heimii*, i *E. hungaricus* izloženih umerenom stresu solima, kako prilikom kratkotrajnog, tako i prilikom dugotrajnog tretmana, što može da ukazuje na značajnu ulogu ovog jedinjenja u odbrambenom odgovoru biljaka. U uslovima dugotrajnog ekstremnog saliniteta, količina p-kumarne kiseline drastično opada kod svih analiziranih vrsta. Za razliku od fenolnih kiselina, sadržaj flavonoida kod mahovina izloženih stresu solima u najvećem broju slučajeva opada. Izuzetak je sadržaj apigenina i rutina kod vrste *P. patens* u uslovima umerenog stresa solima. Takođe, kod vrste *H. heimii* je uočen blagi porast koncentracije analiziranih flavonoida prilikom dugotrajnog izlaganja umerenom stresu solima, uključujući i koncentraciju naringenina. Poznato je da je flavanon naringenin precursor



svih flavona i flavonola analiziranih u okviru ove doktorske disertacije, čime se može objasniti i njegov relativno niski sadržaj u svim analiziranim uzorcima. Porast koncentracije naringenina u uzorcima može ukazivati na njegovu akumulaciju usled redukovano iskorišćavanja u narednim koracima biosintetskog puta, ali, sa druge strane, i na pojačanu biosintezu ovog jedinjenja, što je verovatno slučaj kod vrste *H. heimii*. Generalno se može zaključiti da kod analiziranih mahovina dolazi do modifikacija metabolizma fenolnih jedinjenja tokom izlaganja umerenom stresu solima, i to na način koji dovodi do povećanog metaboličkog fluksa kroz biosintetske puteve koji vode do p-kumarne kiseline, i smanjenog intenziteta biosinteze flavonoida. Izuzetak je vrsta *H. heimii* kod koje je uočena pojačana akumulacija i fenolnih kiselina i flavonoida. Interesantno je takođe istaći da je vrsta *P. patens* generalno bogatija fenolnim kiselinama nego fakultativno halofitne vrste *E. hungaricus* i *H. heimii*.

Dobijeni rezultati u ovom istraživanju za antioksidativnu aktivnost fenolnih jedinjenja kod vrsta *P. patens* i *E. hungaricus* su u korelaciji sa ukupnom koncentracijom fenola u uzorcima, i ukazuju na to da ispitivane vrste koriste antioksidativna svojstva fenola kao jedan od mehanizama tokom odbrambenog odgovora biljaka na uslove povećanog saliniteta. U uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa, antioksidativna aktivnost opada sa opadanjem koncentracije ukupnih fenola. U slučaju *H. heimii*, koja je fakultativni halofit, antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom se povećava do umereno visokih koncentracija NaCl (100 mM), pri čemu se u isto vreme kod biljaka raslih na navedenim koncentracijama soli linerano smanjuje sadržaj ukupnih fenola merenih u ekstraktu. Sadržaj fenola nema visoke vrednosti, što ukazuje na to da se tolerancija vrste *H. heimii* na povećane koncentracije soli ne zasniva na fenolima kao neenzimskoj komponenti odbrane, već u tome bitniju ulogu imaju neke druge komponente koje učestvuju u sistemu zaštite.

NaCl u velikoj meri utiče na sintezu i sadržaj fenolnih jedinjenja, što je pokazanom analizom sadržaja ukupnih fenola kod ispitivanih vrsta Folin-Ciocalteu metodom. Na promenu koncentracija fenola takođe mogu uticati genotip vrste, trajanje tretmana, faza razvića i vreme merenja antioksidativne aktivnosti (Navarro *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008), što je i potvrđeno ovim istraživanjem. Sve tri ispitivane vrste imaju species- specifičan trend promene koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja u



zavisnosti od intenziteta saliniteta. Takođe pokazano je da dužina trajanja stresa daje različite rezultate u kvantitativnom smislu, kada su u pitanju vrste *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* izlagane tri dana i tri nedelje stresu solima. Pokazano je da duže izlaganje stresu solima povećava količinu fenolnih jedinjenja u ispitivanim biljnim vrstama. Međutim, ovakve razlike mogu takođe biti i posledica različitih razvojnih stadijuma protonema analiziranih vrsta.

Pored morfoloških i fizioloških promena, odgovor na osmotski stres, koji je komponenta stresa solima, praćen je i akumulacijom solubilnih šećera kod biljaka (Cho *et al.*, 2009). U zavisnosti od genotipa, vrste i uslova u kojima se biljke nalaze, mogu se akumulirati i neki specifični šećeri (Robinson *et al.*, 2000; Marschall & Laufer, 2002; Pejin *et al.*, 2006; Klavina, 2014).

U toku osmotskog stresa, šećeri koji se sintetišu i akumuliraju, mogu predstavljati neenzimsku komponentu odbrane, koja štiti enzime i druge ćelijske komponente od denaturacije i oštećenja, a mogu predstavljati i signalne molekule u odgovoru biljaka na promene sredine u kojoj se nalaze. Takođe, jedna od veoma značajnih uloga šećera jeste u osmotskom prilagođavanju biljaka zajedno sa drugim solubilnim jedinjenjima (Klavina, 2014). Šećeri često imaju važnu ulogu u regulaciji citoplazmatske pH. Pored toga, šećeri mogu da učestvuju u uklanjanju slobodnih radikala i održavanju odnosa  $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ , kada je aktivna enzimska komponenta odbrane od stresa, ali i da utiču na aktivnost RUBISCO enzima (Sivakumar *et al.*, 2002). U uslovima osmotskog stresa može doći do razgradnje akumuliranih šećera, koji postaju donori neophodnih elektrona za enzime antioksidativne zaštite.

Iako za briofite ne postoji dosta literaturnih podataka o uticaju soli na sintezu i akumulaciju šećera, moguće je uporediti rezultate sa onima dobijenim u tretmanima dehidracije kod briofita, jer i stres solima dovodi do snižavanja vodnog potencijala i do smanjenja turgorovog pritiska. Pokazano je da fruktoza igra značajnu ulogu u osmotskom prilagođavanju zajedno sa drugim solubilnim šećerima kod briofita (Klavina, 2014). Zapaženo je da se kod nekih vrsta mahovina akumuliraju prosti šećeri, ali i skrob, u celim vegetativnim telima u toku dehidracije i da ta osobina predstavlja adaptaciju na date uslove životne sredine. Takođe, poznato je da se kod vaskularnih biljaka akumulira skrob u ranim fazama razvića, posebno kada su biljke izložene povišenim koncentracijama soli, ali i da dolazi do povećane ekspresije gena za

transportere za glukozu i saharozu i povećane aktivnosti hidrolitičkih enzima (Yin *et al.*, 2010).

Međutim, moguće je zapaziti razliku u kompoziciji šećera između vaskularnih biljaka i briofita. Kod briofita skrob ne predstavlja glavni izvor solubilnih šećera, jer ove biljke ne poseduju veliki broj specijalizovanih tela i struktura odgovornih za akumulaciju i sintezu velike količine polisaharida. Stoga se polisaharidi kod mahovina mogu izolovati iz bilo kog dela vegetativnog tela (Klavina, 2014). Kod mahovina se u najvećim količinama može izolovati saharoza, a zatim fruktoza i glukozu, dok se kod jetrenjača, pored saharoze, može primetiti akumulacija poliola: manitola, sorbitola i volemitola (Marschall & Laufer, 2002). Za sve briofite je zajedničko da akumuliraju veoma nisku koncentraciju skroba.

Rezultati disertacije ukazuju na to da je dominantni oblik šećera kod *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* disaharid saharoza, dok su glukozu i fruktozu prisutne u znatno nižim koncentracijama. Izlaganje dugotrajnom stresu solima dovodi do akumulacije šećera u tkivu ispitivanih mahovina, a naročito fruktoze. Međutim, treba imati u vidu da porast koncentracije šećera može biti i posledica razvojnog stadijuma protonema.

Pored antioksidativnog sistema biljaka, osmotsko prilagođavanje je značajan mehanizam prilagođavanja biljke na uslove stresa. U uslovima povišenog saliniteta može doći do pojačane sinteze prolina i šećera. Prolin ima veoma važnu ulogu u zaštiti biljke od osmotskog stresa (Tripathi & Gaur, 2004; Sumithra *et al.*, 2006; Ashraf & Foolad, 2007; Ahmed *et al.*, 2008; Parida *et al.*, 2008). Uloga prolina u uslovima stresa je da doprinese osmotskom prilagođavanju, stabilizaciji membrana, zaštiti procesa fotosinteze i disanja, dok nakon prestanka stresa služi kao izvor ugljenika i azota (Silveira *et al.*, 2003; Kavi Kishore *et al.*, 2005). Određivanje koncentracije prolina i odnosa prolina i slobodnih amino kiselina u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuje različite trendove porasta ili smanjivanja koncentracije prolina u zavisnosti da li su biljke izlagane stresu solima tri dana ili tri nedelje. Nakon tretmana od tri dana, uočava se da je najveće povećanje koncentracije prolina kod vrsta *H. heimii* i *P. patens*, dok kod vrste *E. hungaricus* nije uočena statistički značajnija promena u koncentraciji karotenoida.

## 5.6. Uloga enzima (POX, CAT i SOD) tokom stresa solima kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii*

Pored neenzimskih komponenti i enzimi igraju veoma važnu ulogu u odbrani biljaka od stresa solima, ali i u odbrani od drugih oblika stresova (Moller, 2001., Vranova *et al.*, 2002). Većina, ako ne i svi sredinski stresori, dovode do povećane proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika, koje utiču na redoks homeostazu biljnih ćelija (Dat *et al.*, 2000). Pored peroksidaza i katalaza čija je osnovna uloga u uklanjanju vodonik peroksida iz ćelije, enzim superoksid dismutaza predstavlja prvu liniju odbrane ćelija od ROS (Alcher *et al.*, 2002). Superoksid dismutaza je metaloenzim i učestvuje u razgradnji superoksid anjon radikala, pri čemu štiti ćeliju od dejstva ovog reaktivnog oblika kiseonika.

U ovom istraživanju zabeleženo je da je aktivnost enzima superoksid dismutaze kod biljaka gajenih tri nedelje na medijumu sa solima rasla sa povećanjem koncentracije soli kod fakultativno halofitnih vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*, a da je kod vrste *P. patens* aktivnost ovog enzima opadala sa porastom koncentracije soli. Međutim, aktivnost različitih izoformi se razlikovala kod ispitivanih vrsta. Kod sve tri ispitivane vrste bila je slična aktivnost Mn-SOD izoforme, dok je aktivnost druge dve izoforme Cu/Zn-SOD i Fe-SOD varirala u odnosu na ispitivanu vrstu.

Zbog razlike u aminokiselinskom sastavu različitih izoformi superoksid dismutaza, primećena je različita osetljivost na određene inhibitore, pa je tako forma enzima sa Mn-SOD neosetljiva na inhibiciju sa (CN<sup>-</sup>) i vodonik peroksidom, dok je osetljiva na mešavinu hloroforma i etanola. Fe-SOD je inhibirana vodonik peroksidom, dok je neosetljiva na cijanide (Radojičić, 2006), a Cu/Zn-SOD je osetljiva na cijanide i na vodonik peroksid, a neosetljiva na hloroform i etanol. Ovakva razlika u osetljivosti prema inhibitorima je korišćena i u ovom radu kako bi se detektovale različite forme superoksid dismutaze. Pokazano je da su transgene biljke *A. thaliana* koje su imale povećanu ekspresiju Mn-SOD u mitohondrijama bile otpornije na stres izazvan solima, dok su transgene biljke pirinča sa povećanom ekspresijom istog tipa SOD ispoljavale veću otpornost na sušu (Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Biljke *Nicotiana tabaccum* koje su imale povećanu ekspresiju Cu/Zn-SOD u hloroplastima, bile su

otpornije na oksidativni stres uzrokovan visokim intenzitetom svetlosti i niskim temperaturama (Sen Gupta *et al.*, 1993).

Do variranja u aktivnosti antioksidativnih enzima može doći promenom aktivnosti već postojećih izoformi ili sintezom novih. U ovom istraživanju aktivnost izoformi je varirala u zavisnosti od ispitivane vrste mahovina. Takođe, kod svih vrsta nisu bile sve prisutne izoforme.

Peroksidaze imaju brojne fiziološke uloge i jako su bitne u procesima rastenja i razvića biljaka (Gaspar *et al.*, 1982), kao i u odgovoru biljaka na različite stresove kao što je oksidativni stres (Sgherri *et al.*, 2004; Veljović-Jovanović, 2006). Značajna je aktivnost peroksidaza u odgovoru i zaštiti biljaka od stresa izazvanog visokim koncentracijama soli (Bacardijeva *et al.*, 1996) i jonima metala (Blinde *et al.*, 1996). Regulacija koncentracije vodonik peroksida važna je za biljke kako zbog zaštite ćelije od oksidativnog oštećenja, tako i zbog signalne uloge koju ova reaktivna vrsta kiseonika ima u biljnim ćelijama (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004; Mittler & Poulos, 2005). Biljke imaju nekoliko enzimskih sistema koji uspešno učestvuju u uklanjanju vodonik peroksida, među kojima su najznačajniji: askorbat peroksidaze, katalaze i peroksidaze III klase (Mittler, 2002; Mittler & Poulos, 2005).

Na osnovu dobijenih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji uočeno je da se povećava aktivnost katalaza dejstvom umereno visokih koncentracija NaCl, a da tek na najvišim koncentracijama soli, njena aktivnost opada. Ovakav trend uočen je kod sve tri ispitivane vrste prilikom dugotrajnog stresa solima.

Seckin i saradnici (2009) su pokazali da u korenovima pšenice izloženim povećanoj koncentraciji NaCl dolazi do povećane aktivnosti superoksid dismutaza i katalaza, dok je aktivnost peroksidaza smanjena. Ovakav trend je zabeležen i kod ispitivanih vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*. U ovom istraživanju pokazano je da *P. patens* reaguje smanjenjem aktivnosti superoksid dismutaza, a *E. hungaricus* i *H. heimii* povećanjem aktivnosti SOD kod biljaka koje su izlagane tri nedelje stresu solima. Aktivnost peroksidaze opada povećanjem koncentracije soli, kod biljaka koje su izlagane dugotrajnom stresu kod sve tri ispitivane vrste mahovine.

Za održavanje stabilnog nivoa  $\cdot\text{O}_2^-$  i vodonik peroksida, ključna je koordinacija između aktivnosti superoksid dismutaze i enzima koji uklanjaju vodonik peroksid. Našim istraživanjima je potvrđeno prisustvo peroksidaza i katalaza koje imaju ulogu u uklanjanju vodonik peroksida. Balans između ovih reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i vezivanje jona metala, umanjuje mogućnost formiranja veoma reaktivnog  $\text{HO}^\cdot$  radikala, čime se sprečava nastanak oksidativnih oštećenja (Asada & Takahashi, 1987; Bowler *et al.*, 1992).



# *ZAKLJUČCI*



## 6. ZAKLJUČCI

- ✓ U ovoj disertaciji su razvijeni uspešni protokoli za sterilizaciju gametofita i sporofita i pouzdani protokoli za indukciju pupoljaka kod vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*.
- ✓ Kod vrste *E. hungaricus* porastom koncentracije BAP dolazi do povećanja broja pupoljaka, a kod vrste *H. heimii* povećanje koncentracija BAP u podlozi inhibira stvaranje pupoljaka.
- ✓ Kombinacija visokih koncentracija IBA i BAP inhibitorno utiče na multiplikaciju izdanaka kod obe ispitivane vrste.
- ✓ Ispitivanjem uticaja predtretmana apscisinskom kiselinom pokazuje da niske koncentracije ABA od 0.03 i 0.1  $\mu\text{M}$  stimulativno utiču na produkciju biomase kod vrste *P. patens*.
- ✓ Egzogeno dodata ABA u hranljivu podlogu dovodi do smanjenja koncentracije ukupnih hlorofila i odnosa hlorofila a/b, ali kod vrste *P. patens* na najnižoj koncentraciji stimuliše povećanje koncentracije ukupnih karotenoida.
- ✓ Niske koncentracije ABA od 0.03 i 0.1  $\mu\text{M}$  stimulišu multiplikaciju izdanaka kod vrste *P. patens*, dok kod vrste *A. undulatum* dolazi do opadanja vrednosti indeksa multiplikacije povećanjem koncentracije ABA.
- ✓ Kratkotrajno i dugotrajno izlaganje stresu solima pokazuje da biljke na različit način reaguju na dužinu stresogenog faktora. Kod biljaka gajenih tri dana na podlozi sa solima ne dolazi do nekroze tkiva, dok visoke koncentracije soli kod dugotrajnog stresa dovode do smanjenja procenta preživelih biljaka.
- ✓ Niske koncentracije soli od 5 i 10 mM stimulativno utiču na multiplikaciju izdanaka kod sve tri ispitivane vrste.
- ✓ Kod sve tri ispitivane vrste nisu uočene morfološke promene eksplantata nakon tri dana izlaganja stresu solima.
- ✓ Koncentracija ukupnih karotenoida, kod biljaka koje su izlagane dugotrajnom stresu, opada povećanjem koncentracije soli kod vrsta *P. patens* i *E. hungaricus*, dok je kod vrste *H. heimii* trend drugačiji. Kod biljaka izlaganih tri dana stresu solima na niskim koncentracijama od 5 i 10mM NaCl raste koncentracija ukupnih karotenoida kod vrsta *P. patens* i *H. heimii*.

- ✓ Kod biljaka izlaganih tri dana stresu solima, niske koncentracije soli (5 i 10 mM NaCl) pozitivno utiču na koncentraciju ukupnih hlorofila kod sve tri ispitivane, dok se taj trend nastavlja i pri tretmanu od 50 mM NaCl kod vrste *P. patens*. Kod biljaka izlaganih dugotrajnom stresu solima dolazi do opadanja koncentracije ukupnih hlorofila povećanjem koncentracije soli.
- ✓ Merenjem sadržaja prolina i odnosa prolina i slobodnih aminokiselina može se zaključiti da se odnos menja u zavisnosti da li su biljke izložene stresu solima tri dana ili tri nedelje. Koncentracija prolina opada povećanjem koncentracije soli kod biljaka izlaganih dugotrajnom stresu, ali raste odnos prolina i slobodnih aminokiselina.
- ✓ Kvalitativna analiza fenolnih jedinjenja pokazala je da se povećanjem koncentracije fenola kod dugotrajnog stresa smanjuje broj detektovanih fenolnih jedinjenja. Kod vrste *P. patens* je izmerena najveća količina fenola, bilo da su biljke izlagane kratkotrajnom ili dugotrajnom stresu.
- ✓ Kod ispitivanih vrsta nije detektovan  $\delta$  tokoferol ni na jednom tretmanu. Kod vrste *P. patens* izlagane dugotrajnom stresu uočava se statistički značajan porast koncentracije ukupnih tokoferola kod biljaka gajenih na podlozi sa 50 i 100 mM NaCl.
- ✓ Dominantni oblik šećera kod *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* je disaharid saharoza, dok su glukoza i fruktoza prisutne u znatno nižim koncentracijama.
- ✓ Aktivnost enzima peroksidaza opada povećanjem koncentracije soli pri dugotrajnom izlaganju stresu solima kod sve tri ispitivane vrste. Promena aktivnosti peroksidaza pri kratkotrajnom stresu nije statistički značajna ni kod jedne ispitivane vrste. Najveća aktivnost se beleži kod vrste *P. patens* izlagane tri dana stresu solima.
- ✓ Aktivnost enzima superoksid dismutaze raste kod fakultativno halofitnih mahovina *E. hungaricus* i *H. heimii*, a opada kod *P. patens*, što ukazuje da SOD ima važnu ulogu kod fakultativno halofitnih mahovina izlaganih tri nedelje stresu solima.
- ✓ Katalazna aktivnost kod dugotrajnog stresa ima isti trend za sve ispitivane vrste, gde aktivnost ovog enzima raste do umereno visokih koncentracija soli, a na najvišim koncentracijama dolazi do opadanja aktivnosti katalaza.



- ✓ Broj izoformi peroksidaza je različit kod ispitivanih vrsta i kod *P. patens* i *E. hungaricus* se uočavaju tri POX izoforme, dok su kod vrste *H. heimi* zastupljene dve izoforme ovog enzima.
- ✓ Kod sve tri ispitivane vrste dominantna izoforma katalaza je CAT1, a broj katalaznih izoformi varira u zavisnosti od vrste. Kod *P. patens* detektovana je jedna izoforma, *E. hungaricus* tri izoforme i *H. heimii* dve izoforme.
- ✓ Detektovane su tri izoforme SOD kod sve tri ispitivane vrste (Mn-SOD, Zn/Cu-SOD i Fe-SOD). Kod vrste *E. hungaricus* su detektovane tri forme izoforme Fe-SOD, dok druge dve vrste imaju po jednu izoformu Fe-SOD.
- ✓ Na osnovu svih obrađenih rezultata može se zaključiti da su mehanizmi adaptacije ispitivanih vrsta na povećanu količinu soli u podlozi specifični i da svaka vrsta ima specifičnu strategiju prilagođavanja na izmenjene uslove životne sredine. Kod vrste *P. patens* su značajno više koncentracije fenola nego kod druge dve ispitivane vrste. Može se pretpostaviti da fenoli kod vrste *P. patens* imaju veliki značaj u odgovoru biljaka na stres izazvan solima.
- ✓ Niske koncentracije fenola i povećanje aktivnosti superoksid dismutaza i katalaza, ukazuje na to da enzimi antioksidativne zaštite imaju veoma važnu ulogu u adaptaciji fakultativno halofitnih mahovina *E. hungaricus* i *H. heimii* na povećanu koncentraciju soli.



# *LITERATURA*



## Literatura:

- Ahmad, P., Sharma, S. 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants. *Plant Soil Environ* 54:89-99
- Ahmad, P., Jaleel, C.A., Salem M.A., Nabi, G., Sharma, S. 2010. Roles of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol* 30:161-175
- Ahn, C., Park, U., Park, P.B. 2011. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Arabidopsisthaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* 415: 669–674
- Akiyoshi, K., Etsuko, M., Saori, E., Shinkichi, K., Kazuya, Y., Atsuhiko, S., Hiroyasu, E. 2003. Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate, increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. *Plant Physiology* 132: 1177 – 1185
- Alcher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. 2007. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 372:1331-1341
- Allan, A.C., Fluhr, R. 1997. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9: 1559–1572
- Allen, C.E. 1917. A chromosome differences correlated with sex differences in *Sphaerocarpos*. *Science*, 46:466-467
- Ali, G., Srivastava, P.S., Iqbal, M. 1999. Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in regenerants grown under NaCl stress. *Biologia Plantarum* 42:89-95
- Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55, 373–379.
- Aropa, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82(10):1227-1238
- Arroyo, A., Boss, F., Finkelstein, R.R., Leon, P. 2003. Three genes that affect sugar sensing (abscisic acid insensitive 4, abscisic acid insensitive 5, and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133:231-242
- Asada, K. 1999. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. PlantPhysiol. Plant Mol. Biol.* 50:601–639
- Asada, K., Takahashi, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In *Photoinhibition* (Kyle, D.J. et al., eds), pp. 227–287, Elsevier
- Asakawa, Y. 2007. Biologically active compounds from bryophytes. *Pure and Applied Chemistry* 79(4):557-580
- Ashraf, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Critical Review in Plant Science* 13:17-42
- Ashraf, M., Fooland, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and praline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59:206-216
- Ashton NW, Grimsley N.H., Cove DJ. 1979. Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants. *Planta* 144: 427 435.

- Ashton, N. W., Schulze, A., Hall, P., Bandurski, R. S.** 1985. Estimation of indol - 3-acetic acid in gametophytes of the moss *Physcomitrella patens*. *Planta*, 164:142-144
- Bacardijeva, N.T., Christova, N.V., Christov, K.** 1996. Reaction of peroxidase from different plant species to increased temperatures and the effect of calcium and zinc ions. - In: Obinger, C., Burner U., Ebermann R., Penel C., Greppin H. (eds.). *Plant peroxidases: Biochemistry and physiology*. University of Agriculture, Vienna and University of Geneva, pp. 345-351.
- Baier, M., Dietz, K. J.** 1996. Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Mol. Biol.* 31:553-564
- Bailly, C., Leszczynska, B., Come, R., Corbineau, F.** 2002. Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. *Seed Science Research* 12:47-55
- Balibrea, M.E., Dell Amico, J., Bolarin, M.C., Perez-Alfocea, F.** 2000. Carbon partitioning and sucrose metabolism in tomato plants growing under salinity. *Physiology Plantarum* 110:503-511
- Barthelmess, A.** 1940. Mutationsersuche mit einem Laumboos *Physcomitrium piriforme* II. Morphologische und physiologische Analyse der univalenten und bivalenten Protonemen einiger Mutanten. *Zell Induktion Abstammungs – Vererbungs* 79:153-170
- Basile, A., Giordano, S., Lopez-Saez, J.A., Cobianchi, R.C.** 1999. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry* 52: 1479-1482.
- Bates, J. W., Brown, D. H.** 1975. The Effect of Seawater on the Metabolism of Some Seashore and Inland Mosses. - *Oecologia* 21:335-344
- Bauer, L.** 1966. Isolierung und Testung einer kinetinartigen Substanz aus Kalluszellen von Laubmoosporophyten. *Z. Pflanzenphysiologie* 54: 241-253
- Bauer, L., Mohr, H.** 1959. Der Nachweis des reversiblen Hellrot – Dunkelrot Reaktionssystems bei Laubmoosen. *Planta* 54:69-73
- Beauchamp, C., Fridovich, I.** 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44 (1):276-287
- Baziramakenga R., Leroux G. D., Simard R. R.** 1995. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *Journal of Chemical Ecology* 21(9): 1271 – 1285.
- Becana, M., Tejo, P.A., Irigoyen, J.J., Sanchez-Diaz, M.** 1986. Some enzymes of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa*. *Plant Physiology*, 82:1169-1171
- Becket, H.,** 1999. Partial dehydration and ABA induce tolerance to desiccation-induced ion leakage in the moss *Atrichum androgynum*. *S. Afr. J. Bot.* 65: 212-217
- Beike, A.K., Decker, E.L., Frank, W., Lang, D., Vervilet-Scheebaum, M., Zimmer, A.D., Reski, R.** 2010. Applied Bryology- Bryotechnology. *Tropical Bryology* 31: 22-32

- Benito, B., Rodriguez-Navarro, A.** 2003. Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. - *Plant Journal* 36:382–389
- Beutelmann, P., Bauer, L.** 1977. Purification and identification of a cytokinin from moss callus cell. *Plant* 133:215-217
- Bhatla, S.C.** 1994. Moss protonema differentiation. New York: Wiley
- Bhatla, S.C., Dhingra-Babbar, S.** 1990. Growth regulating substances in mosses. In: Chopra, R.N. and Bhatla, S. C. (eds.). *Bryophyte Development: Physiology and Biochemistry*, CRC Press, Ann Arbor, pp.79-101.
- Bijelović, A.** 2003. Morfogeneza mahovine *Bryum argenteum* Hedw. u kulturi *in vitro*. Magistarska teza, Biološki Fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Bijelović, A., Sabovljević, M.** 2003. Callus induction and plant regeneration in the moss *Aloina aloides* (Schultz.) Kindb. (Pottiaceae, Bryopsida) *Archives of Biological Sciences* 55(3-4): 77-80.
- Bindoli, A.** 1988. Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radical Biology and medicine* 5: 247-261
- Binzel, M.L., Hasegawa, P.M., Rhodes, D., Handa, S., Handa, A.K., Bressan, R.A.** 1987. Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiology* 84:1408-1415
- Blinde, A., Abou-Mandour, A., Azarkovich, M., Brune, A., Dietz, K. J.** 1996. Heavy metal-induced changes in peroxidase activity in leaves, roots and cell suspension cultures of *Hordeum vulgare* L. - In: Obinger C., Burner U., Ebermann R., Penel C., Greppin H (eds.). *Plant peroxidases, biochemistry and physiology*. University of Agriculture, Wien, 374-379.
- Blum, U., Gerig, T.M.** 2005. Relationships between phenolic acid concentrations, transpiration, water utilization, leaf area expansion, and uptake of phenolic acids: nutrient culture studies. *Journal of Chemical Ecology*. 31 (8): 1907 – 1932.
- Bogdanović, M.** 2008. Ispitivanje uticaja soli na morfogenezu i sadržaj hlorofila vrsta *Bryum argenteum* Hedw. i *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. u kulturi *in vitro*. Diplomski rad, Biološki Fakultet Univerziteta u Beogradu
- Bogdanović, M., Sabovljević, M., Sabovljević, A., Grubišić, D.** 2009. The influence of gypsiferous substrata on bryophyte growth: are there obligatory gypsophilous bryophytes? *Botanica Serbica* 33 (1): 75-82.
- Bogdanović, M., Ilić, M., Živković, S., Sabovljević, A., Grubisić, D., Sabovljević, M.** 2011. Comparative study on the effects of NaCl on selected moss and fern representatives. *Australian Journal of Botany* 59(8): 734-740.
- Booker, F.L., Blum, U., Fiscus E.L.** 1992. Short-term effects of ferulic acid on ion uptake and water relations in cucumber seedlings. *Journal of Experimental Botany* 43: 649 – 655.
- Bopp, M.** 1953. Die Wirkung von Heteroauxin auf Protonemawachstum und Knospenbildung von *Funaria hygrometrica*. *Z. Botanik* 41:1-16
- Bopp, M.** 1954. Ein Beitrag zur Differenzierung im Moosprotonema. *Der Dtsch Bot Ges* 67: 177–184
- Bopp, M.** 1955. Die Entwicklung von Zelle und Kern in Protonema von *Funaria hygrometrica*. *Sibth. Planta* 45:573–590

- Bopp, M.** 1959. Versuche zur Analyse von Wachstum und Differenzierung des Laubmoosprotonemas. *Planta* 53:178–197
- Bopp, M.** 1963. Development of the protonema and bud formation in mosses. *Botanical Journal of the Linnean Society* 58: 305–309
- Bopp, M.** 1983. Developmental Physiology of Bryophytes. In: New Manual of Bryology. Ed. R.M. Schuster, Nichinan: Hattori Botanical Laboratory, Vol. I, pp. 276-324
- Bopp, M.** 1990. Hormones of the moss protonema. In: Bryophyte development: physiology and biochemistry. Eds. R.N. Chopra and S.C. Bhatla, CRC Press, Boca Raton, pp. 55-77
- Bopp, M.** 2000. 50 years of the moss story. *Progress in Botany*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 61: 3-34
- Bopp, M., Atzorn, R.** 1992. Hormonelle regulation der moosentwicklung. *Naturwissenschaften* 79: 337-346
- Bopp, M., Werner, O.** 1993. Absciscic acid and desiccation tolerance in mosses. *Botanica Acta*, 106: 103-106.
- Boros, B., Jakabova, S., Dornyeva, A., Horvath, G., Pluhare, Z., Kilar, F., Felinger, A.** 2010. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in Thymus species. *Journal of chromatography A*, 1217: 7972-7980
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D.** 1992. Superoxide dismutases and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:83–116
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D.** 1994. Superoxide dismutases in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 13:199-218
- Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S., De Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., Van Montagu, M., Inzé, D.** 1991. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J.* 10:1723–1732
- Brandes, H.** 1967a. Die Wirkung von Kinetin auf die Protonemaentwicklung verschiedener Laubmoosarten. *Review Bryol Lichenol* 135:158 – 165
- Brandes, H.** 1967b. Der Wirkungsmechanismus des Kinetins bei der Induktion von Knospen am Protonema der Laubmoose. *Planta* 74:55 – 71
- Brandes, H.** 1967c. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Knospenanlagen von Moosprotoneman nach Anfärbung mit Acridinorange. *Planta* 74:45 – 54
- Brandes, H.** 1973. Gametophyte development in ferns and bryophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 43:827-837
- Bradford M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–54
- Bray, E.** 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2(2):48-54
- Carillo, P., Annunziata, M.G., Pontecorvo, G., Fuggi, A., Woodrow, P.** 2011. Salinity Stress and Salt Tolerance. In: *Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptation*. Eds. A.K. Shanker and B. Venkateswarlu, InTech, pp. 21-37
- Charles, A.C., Halliwell, B.** 1980. Effect of hydrogen peroxide on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose biphosphatase. *Biochemical Journal* 189:373-376

- Chen, W.P., Li, P.H., Chen, T.H.H.** 2000. Glycine betaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L.. *Plant Cell Environment* 23:609–618
- Chen, W., Hou, Z., Wu, L., Liang, Y., Wei, C.** 2010. Effects of salinity and nitrogen on cotton growth in arid environment. *Plant Soil* 326:61–73
- Chevalier, C., Yamaguchi, J., McCourt, P.** 1992. Nucleotide sequence of a cDNA for catalase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 99:1726 – 1728
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J.K.** 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* 45:437-448
- Chopra, R.N., Dhingra-Babbar, S.** 1984. Studies on bud induction in the moss *Trematodon brevicalyx* Dixon. *New Phytologist* 97: 613-620.
- Chopra, R.N., Kumra, P.K.** 1988. Biology of Bryophytes. New York: 350pp Wiley
- Chopra, R. N., Bhatla, S. C.** 1990. Bryophyte Development: Physiology and Biochemistry, CRC Press, Ann Arbor, pp. 245-257
- Chopra R.N., Kumra, P.K.** 1990. Protonemal differentiation and bud formation in mosses. In: Chopra RN & Kumra PK. (eds), Biology of bryophytes, pp. 40–46. Wiley Eastern Limited, New Delhi.
- Chopra, R.N., Mehta, P.** 1992. Effect of some chemical factors on protonema growth and bud induction in three mosses grown *in vitro*. *Phytomorphology* 42: 43-55.
- Christianson, M.L.** 1998. A simple protocol for cryopreservation of mosses. *Bryologist* 101: 32-35.
- Christianson, M.L.** 2000. ABA prevents the second cytokinin-mediated event during the induction of shoot buds in the moss *Funaria hygrometrica*. *Amer. J. Bot.* 87: 1540-1545.
- Corpas, F.J., Baroso, J.B., del Rio, L.A.** 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* 6: 145–150
- Corpas, F.J., Sandalio, L.M., del Rio, L.A., Trelease, R.N.** 1998. Copper-zinc superoxide dismutase is a constituent enzyme of the matrix of peroxisomes in the cotyledones of oilseed plants. *New Phytologist*, 138: 307-314
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A.** 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53(3): 449-459
- Cove, D.J.** 2000. The moss, *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19, 275–283.
- Cove, D.J., Ashton, N.W.** 1984. The hormonal regulation of gametophytic development in bryophytes. In: The Experimental Biology of Bryophytes, Eds. A.F. Dyer, J.G.Ducket, London: Academic Press, pp. 177-201
- Cove, D.J., Knight, C.D., Lamparter, T.** 1997. Mosses as model systems. *Trends in Plant Science* 2:99-105
- Cramer, G.R., Läuchli, A., Polito, V.S.** 1985. Displacement of  $\text{Ca}^{2+}$  by  $\text{Na}^{+}$  from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiology* 79:207-211
- Crum, H.** 2001. Structural Diversity of Bryophytes. University of Michigan Press, pp. 379



- Cruz de Carvalho, R., Catalá, M., Marques da Silva, J., Branquinho, C., Barreno, E.** 2012. The impact of dehydration rate on the production and cellular location of reactive oxygen species in an aquatic moss. *Annals of Botany* 110(5): 1007–1016
- Csonka, L.N., Hanson, A.D.** 1991. Procaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Review in Microbiology* 45:569-606
- Cuming, A.** 2011. Molecular bryology: mosses in the genomic era. *Field Bryology* 103: 9–13
- Cvetić, T., Sabovljević, A., Sabovljević, M., Grubišić, D.** 2005. *In vitro* culture and apogamy – alternative pathway in life cycle of the moss *Amblystegium serpens* (Amblystegiaceae). *Archives of Biological Sciences* 57(4): 267-272.
- Dat, J., Vandenabeele, J., Vranova, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F.** 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57:779–795
- Decker, E.L., Reski R.** 2008. Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. *Bioprocess Biosystems engineering* 31: 3-9
- Decker, E.L., Parsons J., Reski R.** 2014. Glyco-engineering for biopharmaceutical production in moss bioreactors. *Frontiers in Plant Science* 5: 1-7
- Decker, E.L., Frank, W., Saringhausen, E., Reski, R.** 2006. Moss systems biology en route: phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biology* 8: 397-405.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S.** 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal* 4:215-223
- Devies, K.J.A.** 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry* 262: 9895-9901
- DeWald, D.B., Torabinejad, J., Jones, C.A., Shope, J.C., Cangelosi, A.R., Thompson, J.E., Prestwich, G.D., Hama, H.** 2001. Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate and inositol 1,4,5-triphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stresses Arabidopsis. *Plant Physiology* 126: 759-769
- Dixon, D.P., Cummins, I., Cole, J.D., Edwards, R.** 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol* 1: 258–266
- Droillard, M. J., Paulin, A.** 1990. Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiology* 94: 1187-1192
- Drumm, H., Schopfer, P.** 1974. Effect of phytochrome on development of catalase activity and isoenzyme pattern in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. A reinvestigation. *Planta* 120: 13–30
- Duckett, J.G., Burch, J., Fletcher, P.W., Matcham, H.W., Read, D.J., Russel, A.J., Pressel, S.** 2004. *In vitro* cultivation of bryophytes: A review of practicalities, problems, progress and promise. *J. Bryol.* 26:3–20.
- Dybling, E., Nelson, J.R., Mitchell, J.R., Sesame, H.A., Gillete, J.R.** 1976. Oxidation of a methylpoda and other catechols by chytochromes R450-generated superoxide anion: possible mechanism of methylpoda hepatitis. *Molecular Pharmacology* 12: 911-920



- Engel, N., Schmidt, M., Lütz, C., Feierabend, J. 2006. Molecular identification, heterologous expression and properties of light-insensitive plant catalases. *Plant Cell Environ* 29: 593-607
- Ergun, N., Topcuoglu, S.F., Yildiz, A. 2002. Auxin (indole-3-acetic acid), Gibberellic acid (GA3), Abscissic acid (ABA) and Cytokinin (Zeatin) production by some species of mosses and lichens. *Turkish Journal of Botany* 26:13-18
- Erxleben, A., Gessler, A., Vervliet-Scheebaum, M., Reski R. 2012. Metabolite profiling of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionary conservation of osmoprotective substances. *Plant Cell Rep* 31:427-436
- Faical, B., Imen, A., Kaouther, F., Moez, H., Habib, K., Khaled, M. 2009. Physiological and molecular analyses of seedlings of two Tunisian durum wheat (*Triticum turgidum* L.) varieties showing contrasting tolerance to salt stress. *Acta Physiol Plant* 31: 145–154
- Feierabend, J. 2005. Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence. In: Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. (Smirnoff N, ed.), pp. 101-140, Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Filippou, P., Bouchagier, P., Skotti, E., Fotopoulos, V. 2014. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. *Environ Exp Bot* 97: 1–10
- Foyer, C.H., Noctor, G. 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist* 146: 359-388
- Foyer, C.H., Noctor, G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355–364.
- Foyer, C.H., Noctor, G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875.
- Frank, W., Ratnadewi, D., Reski, R. 2005. *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta* 220: 384-394
- Frederich, H., Veroustraete, F., DeGreef, J., Rethy, R. 1977. Light enhanced ethylene production in *Marchantia polymorpha* L. *Arch. Internat. Physiol Biochim.* 85: 977-978.
- Friedman, M., 2004. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *J. Agric. Food Chem.* 52, 385–406.
- Frugoli, J.A., Zhong, H.H., Nuccio, M.L., McCourt, P., McPeck, M.A., Thomas, T.L., McClunh, C.R. 1996. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* 112: 327–336
- Galston, A.W., Bonnichsen, R.K., Arnon, D.I. 1951. The preparation of highly purified spinach leaf catalase. *Acta Chemica Scandinavica* 5:781–790
- Galvani, A. 2007. The challenge of the food sufficiency through salt tolerant crops. *Rev Environ Sci Biotechnol* 6: 3–16
- Gaspar, T.H., Penel, C. L., Thorpe, T., Grappin, H. 1982. Chemistry and biochemistry of peroxidases. -In: Gaspar TH, Penel CL, Thorpe T, Grappin H, (eds.) *Peroxidases, a survey of their biochemical and*

- physiological roles in higher plants*, University the Geneve Press, Geneva, pp. 10-60.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F., Dommes, J.** 2002. Concept in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37: 263-285
- Gefferet, J.L., Frahm, J.P., Barthlott, W., Mutke, J.** 2013. Global moss diversity: spatial and taxonomic patterns of species richness. *Journal of Bryology* 35(1): 1-11
- Gill, S.S., Tuteja, N.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930
- Glime, J. M., Rohwer, F.** 1983. The comparative effects of ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid on two species of *Fontinalis*. *J. Bryol.* 12: 611-616.
- Goffinet, B., Shaw, A.J.** 2009. Bryophyte Biology. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Goffinet, B., Buck, W.R., Shaw, A.J.** 2008. Morphology, anatomy and classification of the Bryophyta. In: *Bryophyte Biology*. Eds. Goffinet, B., Shaw, A.J., Cambridge University Press, New York
- Gomez, J.M., Hernandez, J. A., Jimenez, A., del Rio, L. A., Sevilla, F.** 1999. Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research Supplement* 31:11-18
- Gorr, G., Jost, W.** 2005. Glycosilation design in transgenic moss for better product efficacy. *Bioprocessing Journal* 4: 26-30
- Gorton, B. S., Eakin, R. E.** 1957. Development of the gametophyte in the moss *Tortella casepitosa*. *Bot Gaz* 119: 31-38
- Grant, J.J., Loake, G.J.** 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124: 21-29
- Grassmann, J., Hippeli, S., Elstner, E.F.** 2002. Plant's defense and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 471-478
- Grusak, M.A., DellaPenna, D.** 1999. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health<sup>1</sup>. *Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 133-161
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M., Zhu, J.K.** 2001. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* 13: 1383-1400
- Haberlandt, G.** 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber Math-Naturwiss Kl Kais Akad Wiss 111: 454-461
- Hallingbäck, T., Hodgetts, I.** 2000. Mosses, Liverworts and Hornworts; status survey and conservation action plan for bryophytes. IUCN/SSC bryophyte specialist group. Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.** 1989. Free radicals in biology and medicine, 2nd edn. Clarendon, Oxford
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G.** 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791

- Hare, P.D., Cress, W.A.** 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul* 21:79–102
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J.** 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell and Environment* 21: 535-553
- Hartung, W., Hellwege, E.M., Volk, O.H.** 1994. The function of abscisic acid in bryophytes. *J. Hattori Bot. Lab.* 76: 59-65.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M.** 2013. Plant Response to Salt Stress and Role of Exogenous Protectants to Mitigate Salt-Induced Damages. In: Ahmad P, Azooz MM, Prasad MNV (Eds.) *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. Springer Science & Business Media LLC, New York, USA, pp 25-87.
- Havir, E.A., McHale, N.A.** 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84: 450–455
- Héban, C.** 1977. The Conducting Tissues of Bryophytes. J. Cramer, Lehre, Germ.
- Hernandez, J.A., Campillo, A., Jimenez, A., Alarcon, J.J., Sevilla, F.** 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytologist* 141: 241-251
- Hite, D.R.C., Auh, C., Scandalios, J.G.** 1999. Catalase activity and hydrogen peroxide levels are inversely correlated in mainze scutella during seed germination. *Redox Report* 4: 29-34
- Hodgetts, N.** 2010. *Aphanorrhagma patens* (Physcomitrella patens), spreading earth-moss. In Ian Atherton, Sam Bosanquet & Mark Lawley. *Mosses and Liverworts of Britain and Ireland: a Field Guide*, British Bryological Society. p. 567. (ISBN 978-0-9561310-1-0)
- Holappa L.D., Blum U.** 1991. Effects of exogenously applied ferulic acid, a potential allelopathic compounds, on leaf growth, water utilization, and endogenous abscisic acid levels of tomato, cucumber, and bean. *Journal of Chemical Ecology* 17: 865 – 886.
- Hossain, M.A., Fujita, M.** 2010. Evidence for a role of exogenous glycine betaine and proline in antioxidant defense and methyl-glyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress. *Physiol Mol Biol Plants* 16: 19–29
- Hsu, S.Y., Hsu, Y.T., Kao, C.H.** 2003. The effects of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biologia Plantarum* 46:73-78
- Hurel-Py, G.** 1953. Precision sur le mode de bouturage des Mousses et sur l'actin de l'acide naphylacetique sur le developement des tiges feuillees. *CR Soc Biol Paris* 147: 34-36
- Jang, J.C., Leon, P., Zhou, L., Sheen, J.** 1994. Sugar Sensiting in Higher-Plants. *Plant Cell* 6 (11): 1665-1679
- Jimenez A., Gomez J.M., Navarro E., Sevilla F.** 2002. Changes in the antioxidative systems in mitochondria during ripening of pepper fruits. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 515– 520.
- Johri, M.M., Desai, S.** 1973. Auxin regulation of caulonema formation in moss protonema. *Nature (Lond) New Biol* 245: 223-224
- Kalaji, H.M., Govindjee, I., Bosa, K., Koscielniak, J., Zuk-Golaszewska, K.** 2011. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. *Environ Exp Bot* 73: 64–72

- Kanematsu, S., Asada, K.** 1990. Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant Cell Physiology* 31: 99-112
- Kanwischer, M., Porfirova, S., Bergmuller, E., Dormann, P.** 2005. Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiol* 137: 713-23
- Kato, J., Purves, W.K., Phunney, B.O.** 1962. Giberellin-like substances in plants. *Nature* 196: 687-688.
- Kavi Kishore, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N.** 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: the implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88: 424-438
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C.** 1998. A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs. *Plant Cell* 10(2): 255-66
- Kendrick, P., Crane, R.** 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389: 33-39
- Ketchum, R.E.B., Warren, R.C., Klima, L.J., Lopez-Gutierrez, F., Nabors, M.W.** 1991. The mechanism and regulation of proline accumulation in suspension cultures of halophytic grass *Distichlis spicata* L. *Journal of Plant Physiology* 137: 368-374
- Khelil, A., Menu, T., Ricard, B.** 2007. Adaptive response to salt involving carbohydrate metabolism in leaves of a salt-sensitive tomato cultivar. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 551-559
- Klavina, L.** 2014. Polysaccharides from Lower Plants: Bryophytes. *Springer Reference* 1-11
- Knopp, E.** 1936. Zur genetic von Sphaerocarpus (tetradenanalyse Untersuchungen). *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 54: 58-69
- Knoop, B.** 1984. Development in Bryophytes. In: The Experimental Biology of Bryophytes, Eds. A.F. Dyer, J.G. Duckett, Academic Press: London, Orlando, San Diego, New York, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, pp. 143-176
- Koch, K.E.** 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review in Plant Physiology* 47:509-540
- Kofler, L.** 1959. Contribution a l'etude biologique des mousses activees *in vitro*: germination des spores, croissance et developement du protonema chez *Funaria hygrometrica*. *Rev. Bryol.Lichenol* 28: 1-202
- Kohorn, B.D.** 2001. WAKs: cell wall associated kinases. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 529-533
- Koprivova, A., Stemmer, C., Altmann, F., Hoffmann, A., Kopriva, S., Gorr, G., Reski, R., Decker, E.L.** 2004. Targeted knockout of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans. *Plant Biotechnology Journal* 2: 517-523
- Kramer, P.J., Boyer, J. S.** 1995. Water Relations of Plants and Soils. San Diego: Academic Press.

- Krasensky, J., Jonak, C.** 2012. Drought, salt, temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J Exp Bot* 63: 1593-1608
- Kuzniak, E., Urbanek, H.** 2000. The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22:195-203.
- Lal, M.** 1984. The culture of bryophytes including apogamy, apospory, parthenogenesis and protoplasts. In: *The Experimental Biology of Bryophytes*, Eds. A.F. Dyer, J.G. Duckett, Academic Press: London, Orlando, San Diego, New York, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, pp. 177-201
- Lang, F.** 2007. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr* 26: 613S–623S
- Lang, D., Zimmer, A.D., Rensing, S.A., Reski, R.** 2008. Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. *Trends in Plant Science* 13 (10): 542-549
- Le, T.N., McQueen-Mason, S.J.** 2006. Desiccation-tolerant plants in dry environments. *Rev Environ Sci Biotechnol* 5: 269–279
- Lee, S., Lee, E.J., Yang, E.J., Lee, J.E., Park, A.R., Song, W.H., Park, O.K.** 2004. Proteomic identification of annexins, calcium-dependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1378-1391
- Lehnert, B., Bopp, M.** 1983. The hormonal regulation of protonema development in mosses I. Auxin-cytokinin interaction. *Z Pflanzphysiol* 110: 379-391
- Leigh, R.A., Ahmad, N., Wyn Jones, R.G.** 1981. Assessment of glycine betaine and proline compartmentation by analysis isolated beet vacuoles. *Planta* 153: 34-41
- Leon, P., Sheen, J.** 2003. Sugar and hormone connections. *Trends in Plant Science* 8: 110-116
- Li, F., Lei, H.J., Zhao, X.J., Tian, R.R., Li, T.H.** 2011. Characterization of three sorbitol transporter genes in micropropagated apple plants grown under drought stress. *Plant Mol Biol Rep* 30: 123–130
- Lichtenthaler, H.K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382
- Lim, L., Park, K., Kim, B., Jeong J., Kim, H.** 2012. Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprout. *Food Chemistry* 135: 1065-1070
- Liu, T., van Staden, J.** 2000. Selection and characterization of sodium chloride-tolerant callus of *Glycine max* (L.) Merr cv. Acme. *Plant Growth Regulation* 31: 195-207
- Liu, N., Zhong, N. Q., Wang, G.L., Li, L. J., Liu, X. L., He, Y.K., Xia, G. X.** 2007. Cloning and functional characterization of PpDBF1 gene encoding a DRE-binding transcription factor from *Psychomitrella patens*. *Planta* 226: 827-838
- MacMillan, J.** 2001. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria. *J Plant Growth Reg* 20: 387-442.
- Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J.I., Damsz, B., Narasimhan, M.L., Hasegawa, P.M., Joly, R.J., Bressan, R.A.** 2002. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *Plant J* 31: 699–712



- Martinez, E.** 2002. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol* 50: 925-947
- Marschall, M., Laufer, Z.** 2002. Metabolic activity of *Sphagnum recurvum* under different environmental conditions. *Proceeding of the 7<sup>th</sup> Hungarian Congress on Plant Physiology* 46(3-4): 247-248
- Maxwell, D.P., Wang, Y., McIntosh, L.** 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 8271-8276
- Mehta, P., Jajoo, A., Mathur, S., Bharti, S.** 2010. Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiol Biochem* 48: 16-20
- Mersie W., Singh M.** 1993. Phenolic acids affect photosynthesis and protein synthesis by isolated leaf cells of velvet-leaf. *Journal of Chemical Ecology* 19: 1293 – 1301
- Michalski, W.P.** 1996. Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. *Journal of Chromatography* 684: 59-75
- Milošević, S.** 2010. Regeneracija i genetička transformacija biljaka *Impatiens walleriana* L. i *Impatienshawkerii* Bull. u kulturi *in vitro*. Doktorska disertacija, Biološki Fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Minami, A., Nagao, M., Arakawa, K., Fujikawa, S., Takezawa, D.** 2003. Abscic acid-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *Journal of plant physiology* 160: 475-483
- Mishler, B.D.** 2001. The biology of bryophytes- bryophytes aren't just small tracheophytes. *American Journal of Botany* 88: 2129-2131
- Mishler, B.D., Thrall, P.H., Hopple, J.S., De Luna, E., Vilgalys, R.** 1992. A molecular approach to the phylogeny of bryophytes: cladistic analysis of chloroplast-encoded 16S and 23S ribosomal genes. *Bryologist* 95: 172-180
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410
- Mitra, G. C., Allsoop A.** 1959. Effects of kinetin, gibberelic acid and ceratin auxinus on the development of shoot buds on the protonema of *Pohlia nutans*. *Nature* 183: 974 -975
- Mittler, R., Zilinskas, B.A.** 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolim. *Analytical Biochemistry* 212:540-546
- Mittler, R., Poulos, T.L.** 2005. Ascorbate peroxidase. In: Antioxidants and reactive oxygen species in plants (Smirnoff N, ed.), 87-100, Oxford, Blackwell Publishing.
- Moller, I.M.** 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 561-591
- Mowat, J.A.** 1965. A survey of results on the occurrence of auxins and gibberellins in algae. *Botanica Marina* 8: 149- 155
- Munne-Bosch, S., Alegre, L.** 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 31-57

- Munnik, T., Meijer, H.J., Ter Riet, B., Hirt, H., Frank, W., Bartels, D., Musgrave, A.** 2000. Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the level of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Journal* 22: 147-154
- Munns, R.** 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell and Environment* 16: 15-24
- Munns, R.** 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment* 25: 239-250
- Munns, R.** 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167: 645-663
- Munns, R., Tester, M.** 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681
- Munoz, J., Felicísimo, A.M., Cabezas, F., Burgaz, A.R., Martínez, I.** 2004. Wind as a Long-Distance Dispersal Vehicle in the Southern Hemisphere. *Science* 304: 1144-1147
- Murashige, T., Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15: 473-497
- Nanjo, T., Fujita, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K.** 2003. Toxicity of free proline revealed in *Arabidopsis* T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiology* 44: 541-548
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshida, Y., Sanada, Y., Wada, K., Tsukaya, H., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** 1999. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 18: 185-193
- Navarro, J.M., Flores, P., Garrido, C., Martínez, V.** 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry* 96(1): 66-73
- Nešković, M., Konjević, R., Čulafić, L.** 2003. Fiziologija biljaka. NNK Interantional, Beograd
- Newman, T., de Bruijn, F., Green, P., Keegstra, K., Kende, H., McIntosh, L., Ohlrogge, J., Raikhel, N., Somerville, S., Thomashow, M., Retzel, E., Somervilles, C.** 1994. Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiology* 106: 1241-1255
- Ni, W., Trelease, R.N., Eising, R.** 1990. Two temporally synthesized charge subunits interact to form the five isoforms of cottonseed (*Gossypium hirsutum*) catalase. *Biochemical Journal* 269: 233-238
- Nilsen, E., Orcutt, D.M.** 1996. The physiology of plants under stress - abiotic factors. John Wiley and Sons, Inc, New York, 689.
- Noctor, G., Foyer, C.** 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279
- Okuma, E., Soeda, K., Tada, M., Murata, Y.** 2000. Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 46: 257-263
- Oono, Y., Ooura, C., Rahnman, A., Aspúria, E.T., Hayashi, K., Tanaka, A., Uchimiya, H.** 2003. *p*-chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in *Arabidopsis* root. *Plant Physiology* 133: 1135-1147

- Ota, Y., Ario, T., Hayashi, K., Nakagawa, T., Hattori, T., Maeshima, M., Asahi, T. 1992. Tissue-specific isoforms of catalase subunits in castor bean seedlings. *Plant Cell Physiology* 33: 225–232
- Otter, T., Polle, A. 1994. The influence of apoplastic ascorbate on the activities of cell wall-associated peroxidase and NADH oxidase in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Cell Physiology* 35: 1231–1238
- Ozturk, L., Demir, Y. 2002. *In vivo* and *in vitro* protective role of praline. *Plant Growth Regulation* 38: 259–264
- Pantović, J., Grdović, S., Sabovljević, A., Sabovljević, M. 2014. New and interesting bryophyte records for the flora of Serbia. *Archives of Biological Sciences* 66(2): 701–704
- Papadakis, A.K., Roubelakis-Angelakis, K.A. 2002. Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplast. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 549–559
- Parida, A.K., Das, A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effect on plants: a review. *Ecotox Environ Safe* 60: 324–349
- Parida, A.K., Dagaonkar, V.S., Phalak, M.S., Aurangabadkar, L.P. 2008. Differential responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery. *Acta Physiol Plant* 5: 619–627
- Pejin, B., Sabovljević, A., Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Vujičić, M., Sabovljević, M. 2012. Antimicrobial activity of *Rhodobryum ontariense*. *Hemijaska Industrija* 66(3): 381–384.
- Pejin, B., Iodice, C., Tommonaro, G., Savovljević, M., Bianco, A., Tešević, V., Vajst, V., De Rosa, S., 2012a. Sugar composition of the moss *Rhodobryum ontariense* (Kindb.) Kindb. *Natural Product Research* 26(3): 209–215
- Penuelas, J., Ribas-Carbo, M., Giles, L. 1996. Effects of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase. *Journal of Chemical Ecology* 22: 801 – 805.
- Pilon-Smits, E.A.H., Terry, N., Sears, T., Van Dun, K. 1999. Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiol Biochem* 37: 313–317
- Polle, A. 2001. Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate peroxidase–glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol* 126: 445–462
- Porfirova, S., Bergmuller, E., Tropf, S., Lemke, R., Dormann, P. 2002. Isolation of an Arabidopsis mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12495–12500
- Qui, Y.-L. 2008. Phylogeny and evolution of charophytic algae and land plants. *Journal of Systematics and Evolution* 46: 287–306
- Radley, M. 1961. Gibberellic acid-like substances in plants. *Nature* 191: 684–685.
- Radojičić, R.M. 2006. Oksidativni stres i antioksidativna zaštita. In: *Opšta ekofiziologija*, Zavod za udžbenike, Beograd, 182–223.
- Rahnama, H., Ebrahimzadeh, H. 2006. Antioxidant isozymes activities in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) under salt stress. *Journal of Science, Islamic Republic of Iran* 17(3): 225–230



- Ranganayakulu, G.S., Veeranagamallaiah, G., Sudhakar, C.** 2013. Effect of salt stress on osmolyte accumulation in two groundnut cultivars (*Arachis hypogaea* L.) with contrasting salt tolerance. *Afr J Plant Sci* 12:586–592
- Rama Devi, S., Prasad, M. N. V.** 1992. Effect of ferulic acid on growth and hydrolytic enzyme activities of germinating maize seeds. *Journal of Chemical Ecology* 18 (11): 1981–1990.
- Reski, R.** 1998a. Development, genetics and molecular biology of mosses. *Botanica Acta* 111: 1-15
- Reski, R.** 1998b. *Physcomitrella* and *Arabidopsis*; the David and Goliath of the reverse genetics. *Trends in Plant Science* 3: 209–210
- Reski, R.** 1999. Molecular genetics of *Physcomitrella*. *Planta* 208: 301–309
- Reski, R., Frank, W.** 2005. Moss (*Physcomitrella patens*) functional genomics - Gene discovery and tool development, with implications for crop plants and human health. *Briefings in functional genomics and proteomics* 4 (1): 48-57
- Rensing, S.A., Lang, D., Zimmer, A.D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.F., Lindquist, E., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S.I., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Ashton, N., Anterola, A., Aoki, S., Barbazuk, W.B., Barker, E., Bennetzen, J., Blankenship, R., Cho, S.H., Dutcher, S., Estelle, M., Fawcett, J.A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K.A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, R., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S.H., Stueber, K., Theodoulou, F.L., Tu, H., Van de Peer, Y., Verrier, P.J., Waters, E., Wood, A., Yang, L., Cove, D., Cuming, A.C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B.D., Reski, R., Grigoriev, I., Quatrano, R.S., Boore, J.L.** 2008. The *Physcomitrella* genome reveals insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69
- Rezazadeh, A., Ghasemnezhad, A., Barani, M., Telmadarrehei, T.** 2012. Effect of salinity on phenolic composition and antioxidant activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves. *Research Journal of Medicinal Plant* 6: 245-252
- Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A., Rich, P.J.** 2002. Salinity, osmolytes and compatible solutes. In: *Salinity: Environment – Plants – Molecules*, Lauchli, A., Luttge, U. (Eds.). Kluwer Academic, Boston, N.Y. pp. 181-204
- Richardson, D.H.S.** 1981. *The Biology of mosses*. Blackwell Scientific Publications. pp. 219
- Rizhsky, L., Hallak-Herr, E., Van Breusegem, F., Rachmilevich, S., Barr J.E., Rodermeel, S., Inze, D., Mittler, R.** 2002. Double antisense plants with suppressed expression of ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants with suppressed expression of ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J.* 32(3): 329-342
- Robinson, S.A., Wasley, J., Popp, M., Lovelock C.E.** 2000. Desiccation tolerance of three moss species from continental Antarctica. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 2-23

- Rohwer, F., Bopp, M.** 1985. Ethylene synthesis in moss protonema. *J. Plant Physiol.* 117: 331-338.
- Roitch, T.** 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 198-206
- Rolland, F., Moore, B., Sheen, J.,** 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14: S185-S205
- Rolland, F., Baena-Gonsales, E., Sheen, J.** 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Reviews in Plant Biology* 57: 675-709
- Ros, R.M., Mazimpaka, V., Abou-Salama, U., Aleffi, M., Blockeel, T.L., Bragues, M., Cano, M.J., Cros, R.M., Dia, M.G., Dirkse, G.M., El-Saadawi, W., Erdag, A., Ganeva, A., Gonzales-Mancebo, J.M., Herrnstadt, I., Khalil, K., Kürschner, H., Lanfranco, E., Losada-Lima, A., Refai, M.S., Rodriguez-Nunez, S., Sabovljevic, M., Sergio, C., Shabbara, H.M., Sim-Sim, M., Söderström, L.** 2007. Hepatics and Anthocerotales of the Mediterranean, an annotated checklist. *Cryptogamie, Bryologie* 28(4): 351-437
- Ros, R.M., Mazimpaka, V., Abou-Salama, U., Aleffi, M., Blockeel, T.L., Bragues, M., Cros, R.M., Dia, M.G., Dirkse, G.M., Draper, I., El-Saadawi, W., Erdag, A., Ganeva, A., Gabriel, R.M.A., Gonzales-Mancebo, J.M., Granger, C., Herrnstadt, I., Hugonnot, V., Khalil, K., Kürschner, H., Losada-Lima, A., Luis, L., Mifsud, S.D., Privitera, M., Puglisi, M., Sabovljevic, M., Sergio, C., Shabbara, H.M., Sim-Sim, M., Sotiaux, A., Tacchi, R., Vanderpoorten, A., Werner, O.** 2013. Mosses of the Mediterranean, an annotated checklist. *Cryptogamie, Bryologie* 34(2): 99-283
- Rothe, G. M.** 2002. Enzyme assays after gel electrophoresis. In: Enzyme Assays, A Practical Approach, 2<sup>nd</sup> edition, Eisenthal, R. and Danson, M. J. (eds), Oxford University Press, Oxford: 198.
- Rowntree, J.K.** 2006. Development of novel methods for the initiation of *in vitro* bryophyte cultures for conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87: 191-201
- Ruibal, C., Castro, A., Carballo, V., Szabados, L., Vidal, S.** 2013. Recovery from heat, salt and osmotic stress in *Physcomitrella patens* requires a functional small heat shock protein *PpHsp 16.4*. *BMC Plant Biology* 13: 174
- Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B., Vidal, S.** 2006. A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *Plant J* 45: 237-249
- Sabovljević, M.** 2000. Flora Mahovina Deliblatske Peščare. Diplomski rad. Biološki Fakultet Univerziteta u Beogradu. pp. 87
- Sabovljevic, M., Natcheva, R.** 2006. Checklist of the liverworts and hornworts of South-Eastern Europe. *Phytologia Balcanica* 12(2): 169-180
- Sabovljević, M., Sabovljević, A.** 2007. Contribution to the coastal bryophytes of the Northern Mediterranean: Are there halophytes among bryophytes? *Phytologia Balcanica* 13(2): 131-135
- Sabovljević, A., Sabovljević, M.** 2008. Bryophytes, a source of bioactive and new compounds, In: Phytopharmacology and Therapeutic Values IV, the

- Series "Recent Progress in Medicinal Plants". Edited by: Govil, J. N. pp. 9-25.
- Sabovljević, M., Sabovljević, A.** 2010. Potentials of bryophytes for biotechnological use. *In: Compendium of bioactive natural products V.1 - Potential & Challenges*. Edited by: Govil, J.N.
- Sabovljević M, Bijelović A, Dragičević I.** 2002. Effective and easy way of establishing *in vitro* culture of mosses, *Bryum argenteum* Hedw. and *Bryum capillare* Hedw. (Bryaceae). *Archives of Biological Sciences* 54 (1-2): 7P-8P
- Sabovljević, M., Bijelović, A., Dragičević, I.** 2003. *In vitro* culture of mosses: *Aloina aloides* (K.F.Schultz) Kindb., *Brachythecium velutinum* (Hedw.) B.S. & G., *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid., *Eurhynchium praelongum* (Hedw.) B.S. & G. and *Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm. *Turkish Journal of Botany* 27: 441-446
- Sabovljević, M., Cvetić, T., Stevanović, V.** 2004. Bryophyte Red List of Serbia and Montenegro. *Biodiversity and Conservation* 14: 1781–1790
- Sabovljević, A., Sabovljević, M., Grubišić, D.** 2010. Giberellin influence on the morphogenesis of the moss *Bryum argenteum* Hedw. in *in vitro* conditions. *Arch BiolSci* 62: 373-380
- Sabovljević. M., Vujičić, M., Sabovljević A.** 2014. Plant growth regulators in bryophytes. *Botanica Serbica* 38 (1): 99-107
- Sabovljević, A., Soković, M., Sabovljević, M., Grubišić, D.** 2006. Antimicrobial activity of *Bryum argenteum*. *Fitoterapia* 77: 144-145
- Sabovljević, M., Natcheva, R., Dihoru, G., Tsakiri, E., Dragičević, S., Erdag, A., Papp, B.** 2008. Check-list of the mosses of Southeast Europe. *Phytologia Balcanica* 14(2): 207-244
- Sabovljević, A., Soković, M., Glamoclija, J., Ćirić, A., Vujičić, M., Pejin, B., Sabovljević, M.** 2011. Bio-activities of extracts from some axenically farmed and naturally grown bryophytes. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(4): 565-571
- Sabovljević, M., Papp, B., Sabovljević, A., Vujičić, M., Szurdoki, E., Segarra-Moragues, J.G.** 2012a. *In vitro* micropropagation of rare and endangered moss *Entosthodon hungaricus* (Funariaceae) *Bioscience Journal* 28(4): 632-640
- Sabovljević, M., Vujičić, M., Sinzar-Sekulic, J., Segarra-Moragues, J.G., Papp, B., Skorić, M., Dragačević, L., Sabovljević, A.** 2012b. Reviving, *in vitro* differentiation, development and micropropagation of the rare and endangered moss *Bruchia vogesiaca* (Bruchiaceae) *HortScience* 47(9): 1347–1350
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., Yamasaki, H.** 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolic-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177: 67-80
- Salin, M.L.** 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum* 72: 681-689
- Salisbury, F.B., Ross, C.W.** 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company: Belmont, California. pp. 368-369
- Saradhi, P., Alia, P., Arora, S., Prasad, K.V.** 1995. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 1–5

- Satoh, R., Nakashima, K., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2002. ACTCAT, a novel cis-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene encoding proline dehydrogenase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 130: 709-719
- Savoure, A., Jaoua, S., Hua, X.J., Ardiles, W., Van Montagu, M., Verbruggen, N. 1995. Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 372: 13-19
- Sawahel, W. 2004. Improved performance of transgenic glycine betaine-accumulating rice plants under drought stress. *Biol Plant* 47: 39-44
- Scandalios, J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101: 7-12
- Scandalios, J. G., Guan, L., Polidoros, A. N. 1997. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. In: *Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defences* (Scandalios, J. G., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, pp. 343-406
- Schaefer, D.G. 2002. A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Plant Biology* 53: 477-501
- Schaefer, D.G., Zryd J-P. 1997. "Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*". *Plant Journal* 11(6): 1195-1206
- Schofield, W.B. 2002. *Introduction to Bryology*. Oregon State University Press, Oregon, USA
- Schumaker, K.S., Dietrich, M.A. 1998. Hormone – induced signalling during moss development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 501-523
- Seckin, B., Sekmen, A.H., Turkan, I. 2009. An enhancing effect of exogenous mannitol on the antioxidant enzyme activities in root of wheat under salt stress. *J Plant Growth Regul* 28: 12 – 20
- Sen Gupta, A., Heinen, J.L., Holaday, A.S., Burke, J.J., Allen, R.D. 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that over-express chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1629-1633
- Servettaz, C. 1913. Recherches expérimentales sur le développement et la nutrition des mousses en milieux stérilisés. *Annales de Sciences Naturelles, Biologie Vegetal* 17: 111-223
- Sgherri, C., Stevanović, B., Navarri-Izzo F. 2004. Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum* 122: 478-485.
- Shahbaz, M., Mushtaq, Z., Andaz, F., Masood, A. 2013. Does proline application ameliorate adverse effects of salt stress on growth, ions and photosynthetic ability of eggplant (*Solanum melongena* L.)? *Sci Hortic* 164: 507-511
- Sharma, P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli, M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, pp. 1-26, doi:10.1155/2012/217037

- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., Zhu, J.K.** 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> antiporter. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97: 6896-6901
- Shigeru, S., Takahiro, I., Masahiro, T., Yoshiko, M., Toru, T., Yukonori, Y.** 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53 (372): 1305–1319
- Simonović, A.** 2011. Biotehnologija i genetičko inženjerstvo biljaka. NNK-Internacional, Beograd
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V.P., Prasad, S.M.** 2015. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 14: 407–426
- Siripornadulsil, S., Train, S., Verma, D.P.S., Sayre, R.T.** 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* 14: 2837–2847
- Sivakumar, P., Sharmila, P., Jain, V., Saradhi, P.P.** 2002. Sugars have potential to curtail oxygenase activity of Rubisco. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298: 247-250
- Skoog, F., Miller, C.O.** 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue culture *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* 11: 118-131
- Slater, A., Scott, N.W., Fowler, M.R.** 2008. Strategies for engineering stress tolerance. In: Plant Biotechnology. The genetic manipulations of plants. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 212-236
- Smeekens, S.** 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 49-81
- Smirnoff, N., Cumbes, Q.J.** 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28: 1057–1060
- Smith, A.J.E.** 1982. Bryophyte Ecology. Cambridge University Press.
- Smith, A.M., Zeeman, S.C., Smith, S.M.** 2005. Starch degradation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 73-98
- Sokal, I., Kuta, E., Przywara, L.** 1997. Callus induction and gametophyte regeneration in moss cultures. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 39: 35–42
- Sood, S.** 1975. Morphogenetic studies on *Pogonatum aloides*. *Beitr Biol Pflanz* 51: 99-110
- Souza, J. S., Johri, M. M.** 2002. ABA and NaCl activate myelin basic protein kinase in the chloronema cells of the moss *Frunaria hygrometrica*. *Plant Physiol Biochem* 40: 17-24
- Spiecess, L.D., Lippincott, B.B., and Lippincott, J.A.** 1973. Effect of hormone and vitamine B on gametophore development in the moss *Pylaisiella selwynii*. *Amer. J. Bot.* 60: 708-716
- Stange, L., Osborne, D.J.** 1988. Cell specificity in auxin- and ethylene-induced 'supergrowth' in *Riella helicophylla*. *Planta* 175: 341-347
- Stevanović, B.M., Janković, M.M.** 2001. Ekologija biljaka sa osnovama fiziološke ekologije biljaka. NNK Internacional, Beograd
- Stikić, R., Jovanović, Z.** 2012. Fiziologija stresa biljaka, Univerzitet u Beogradu Poljoprivredni fakultet.
- Sumithra, K., Jutur, P.P., Carmel, B.D., Reddy, A.R.** 2006. Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: responses of antioxidative and proline metabolism. *Plant Growth Regul.* 50: 11–22.



- Szweykowska, A.** 1962. The effects of kinetin and IAA on shoot development in *Funaria hydrometrica* and *Ceratodon purpureus*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 31: 553-557
- Szweykowska, A., Dornowska, E., Cybulska, A., Wasiek, G.** 1971. The cell division response to cytokinins in isolated cell cultures of the protonema of *Funaria hygrometrica* and its comparison with the bud induction response. *Biochem Physiol Pflanz* 162: 514
- Taiz, L., Zeiger, E.** 2010. Plant Physiology. Fifth Edition. Sinauer Associates, Inc.
- Takezawa, D., Minami, A.** 2004. Calmodulin-binding proteins in Bryophytes: identification of abscisic acid-, cold- and osmotic stress-induced genes encoding novel membrane-bound transporter-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 428-436.
- Talat, A., Nawaz, K., Hussain, K., Bhatti, K.H., Siddiqi, E.H., Khalid, A., Anwer, S., Sharif, M.U.** 2013. Foliar application of proline for salt tolerance of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *World Appl Sci J* 4: 547-554
- Takahama, U., Hirotsu, M., Oniki, T.** 1999. Age-dependent changes in levels of ascorbic acid and chlorogenic acid, and activities of peroxidase and superoxide dismutase in the apoplast of tobacco leaves: mechanism of the oxidation of chlorogenic acid in the apoplast. *Plant Cell Physiology* 40: 716-724
- Takahachi, M.A., Asada, K.** 1983. Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch Biochem Biophys* 226: 558-566
- Takezawa, D., Minami, A.** 2004. Calmodulin-binding proteins in bryophytes: identification of abscisic acid-, cold-, and osmotic stress-induced genes encoding novel membrane-bound transporter-like proteins, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317: 428-436
- Tarakhovskaya, E.R., Maslov, Y.I., Shishova, M.F.** 2007. Phytohormones in Algae. *Russian Journal of Plant Physiology* 54: 163-170
- Tolbert, N.E.** 1980. The biochemistry of plants; Tolbert N. E. (ed.) Academic press: New York, 1: 359-388
- Trebst, A.** 2003. Function of  $\beta$ -carotene and tocopherol in photosystem II. *Z Naturforsch* 58: 609-620.
- Trebst, A., Depka, B., Hollander-Czytko, H.** 2002. A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 43: 2157-2162
- Tripathi, B.N., Gaur, J.P.** 2004. Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta* 219: 397-404
- Turgeon, R.** 1989. The sink-source transition in leaves. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 119-138
- Umezawa, T.** 2003. Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 2: 371-390
- Urao, T., Yabukov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., Shinozaki, K.** 1999. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* function as an osmosensor. *Plant Cell* 11: 1743-1754

- USSL 2005. George E. Brown, Jr Salinity Laboratory.** US Dep Agric Res Serv Riverside, CA, USA, USDA-ARS (<http://www.ussl.ars.usda.gov>).
- Vaarma, A., Taren, N.** 1963. On the separate and combined effects of calcium, kinetin and gibberelic acid on the development of moss protonemata. *Journal of the Linnean Society (Botany)*, 58: 279-304
- Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J.F., Inzé, D.** 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161(3): 405–414
- Veljović-Jovanović, S., Kukavica, B., Stevanović, B., Navari-Izzo, F.** 2006. Senescence and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. *Journal of Experimental Botany* 57: 1759-1768.
- Verbruggen, N., Villarroel, R., Van Montagu, M.** 1993. Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 103: 771–781
- Verbruggen, N., Hermans, C.** 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35: 753-759
- Von Schwarzenberg K.** 2009. Hormonal regulation of development by auxin and cytokinin in moss. In: Knight C., Perroud P-F & Cove D. (eds.). The moss *Physcomitrella patens*. Wiley-Blackwell. *Annual Plant Reviews* 36: 246-281.
- Vranova, E., Inze, D., Van Breusegem, F.** 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53: 671-677
- Vujičić, M., Sabovljević A., Sabovljević, M.** 2009. Axenically culturing the bryophytes: a case study of the moss *Dicranum scoparium* Hedw. (Dicranaceae, Bryophyta). *Botanica Serbica* 33(2): 137-140.
- Vujičić, M., Cvetić, T., Sabovljević, A., Sabovljević, M.** 2010. Axenically culturing the bryophytes: a case study of the liverwort *Marchantia polymorpha* L. ssp. *ruderalis* Bischl. & Boisselier (Marchantiophyta, Marchantiaceae). *Kragujevac Journal of Science* 32: 73-81
- Vujičić, M., Sabovljević A., Sabovljević, M.** 2011. Axenically culturing the bryophytes: establishment and propagation of the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. (Bryophyta, Hypnaceae) in *in vitro* conditions. *Botanica Serbica* 35(1): 71-77
- Vujičić, M., Sabovljević, A., Sinzar-Sekulić, J., Skorić, M., Sabovljević, M.** 2012. *In vitro* development of the rare and endangered moss *Molendia hornschi* (Hook.) Lindb. ex Limpr. (Pottiaceae, Bryophyta). *HortScience* 47(1): 84-87
- Vujičić, M., Sabovljević, A., Milošević, S., Segarra-Moragues, J.G., Sabovljević, M.** 2015. Effects of abscisic acid (ABA) on development of selected bryophyte species. *Plant Biosystems*, DOI: 10.1080/11263504.2014.1000423.
- Wang, Y., Ying, Y., Chen, J., Wang, X.** 2004. Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Sci* 167: 671–677
- Wang, F.Z., Wang, Q.B., Kwon, S.Y., Kwak, S.S., Su, W.A.** 2005. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *J Plant Physiol* 162: 465–472.

- Wang, X., Lui, Z., Yikun, H.** 2008a. Responses and tolerance to salt stress in bryophytes. *Plant Signaling and Behavior* 3(8): 516-518
- Wang, X., Yang, P., Gao, Q., Liu, X., Kuang, T., Shen, S., He, Y.** 2008b. Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in *Physcomitrella patens*. *Planta* 228: 167-177
- Wani, S.H., Singh, N.B., Haribhushan, A., Mir, J.I.** 2013. Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance-role of glycine betaine. *Curr Genomics* 14: 157-165
- Watanabe, S., Kojima, K., Ide, Y., Sasaki, S.** 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperature: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14
- Weber, H., Borisjuk, L., Wobus, U.** 2005. Molecular physiology of legume seed development. *Annual Review of Plant Biology* 56: 253-279
- Weise, A., Rodriguez-Franco, M., Timm, B., Herman, M., Link, S., Jost, W., Gorr, G.** 2007. Use of *Physcomitrella patens* actin 5' regions for high transgene expression: importance of 5' introns. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 337-345
- Welinder, K.G., Gajhede, M.** 1992. Structure and evolution of peroxidases. In: *Plant peroxidases. Biochemistry and physiology*. Eds. Welinder, K.G., Rasmussen, S.K., Penel, C., Greppin, H., Rochat-Baumann, Inprimerie Nationale, Geneva, pp. 35-42
- Werner, J.E., Finkelstein, R.R.** 1995. Arabidopsis mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiologia Plantarum* 93:659-666
- Werner, O., Espin, R. M. R., Bopp, M., Atzorn, R.** 1991. ABA induced drought tolerance in *Funaria hygrometrica* Hedw. *Planta* 186: 99-103.
- Willekens, H., Inze, D., Van Montagu, M., Van Camp, W.** 1995. Catalases in plants. *Molecular Breeding* 1: 207-228
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inze, D., Van Camp, W.** 1997. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C-3 plants. *EMBO J.* 16: 4806-4816
- Weng, J. K., Chapple, C.** 2010. The origin and evolution of lignin biosynthesis New Phytologist. 187: 273-285
- Williamson, J.D., Scandalios, J.G.** 1993. Response of the maize catalases and superoxide dismutases to cercosporin-containing fungal extracts: the pattern of catalase response in scutella is stage specific. *Physiologia Plantarum* 88: 159-166
- Woodbury, W., Spencer, A.K., Stahmann, M.A.** 1971. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry* 44: 301-305
- Wojtaszek, P.** 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *The Biochemical Science*, 9: 13-17
- Wojtyla, L., Garneczarska, M., Zalewski, T., Bednarski, W., Ratajczak, L., Jurga, S.** 2006. A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seed. *Journal of Plant Physiology* 163:1027-1220



- Wu, K., Roonez, M. F., Ferl, R. J.** 1997. The Arabidopsis 14-3-3 multigeny family. *Plant Physiol* 114: 1421-1431
- Xiao, W., Sheen, J., Jang, J.C.** 2000. The role of hexocinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology* 44: 451-461
- Yasumura, Y., Crumpton-Taylor, M., Fuentes, S., Harberd, N.P.** 2007. Step-by-step acquisition of the gibberellin-DELLA growth-regulatory mechanism during land-plant evolution. *Current Biology* 17: 1225-1230.
- Yin, Y., Kobayashi, Y., Sanuki, A., Kondo, S., Fukuda, N., Ezura, H., Sugaya, S., Matsukura C.** 2010. Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. 'Micro-Tom') fruits in an ABA- and osmotic stress-independent manner. *Journal of Experimental Botany* 61(2): 563-574
- Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Harada, Y., Shinozaki, K.** 1995. Correlation between the induction of a gene for D1- pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J* 7: 751-760
- Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol* 38: 1095-1102
- Zhang, L., Tian, L.-H., Zhao, J.-F., Song, Y., Zhang, C.-J., Guo, Y.** 2009. Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology* 149: 916-928
- Zhu, J.K.** 2002. Salt and drought signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247-273
- Zhu, J.K.** 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 441-445
- Zhu, J.K., Liu, J.P., Xiong, I.M.** 1998. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell* 10: 1181-1191
- Živković, S.** 2011. Otpornost zlatne paprati (*Asplenium ceterach* L.) prema vodnom stresu: Karakterizacija i značaj antioksidativnih sistema. Doktorska disertacija, Biološki Fakultet Univerziteta u Beogradu
- Yoshioka, H., Sugie, K., Park, H.-J., Maeda, H., Tsuda, N., Kawakita, K., Doke, N.** 2001. Induction of plant gp91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid and salicylic acid in potato. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14: 725-736

## BIOGRAFIJA

**Milorad Vujičić** rođen je u Čačku 30.8.1984. godine gde je završio osnovnu i srednju školu (Gimnaziju prirodno-matematički smer). Tokom srednje škole bio je polaznik Istraživačke stanice Petnica u grupi za biologiju, a nakon upisanih studija godinu dana bio je mlađi saradnik. Tokom srednje škole dva puta je učestvovao na republičkom takmičenju iz biologije, osvojivši 2003. godine drugo mesto na republičkom takmičenju.

Nakon završene Gimnazije upisao je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu 2003. godine. Na četvrtoj godini upisao je smer Fiziologija biljaka. Tokom studija radio je kao demonstrator na predmetima Fiziologija biljaka i Kultura biljnih ćelija i tkiva.

Diplomski rad iz oblasti fiziologije i molekularne biologije biljaka pod naslovom "Uticaj apcisinke kiseline i polietilenglikola na morfogenezu odabranih predstavnika briofita" položio je sa ocenom deset. Fakultet je završio 2009. godine sa prosečnom ocenom 8.91. Govori engleski jezik. Nakon završenih osnovnih studija upisao je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na studijskoj grupi biologija, modul- fiziologija i molekularna biologija biljaka. Doktorske studije je završio sa prosečnom ocenom 9.72.

Zaposlen je od 2009. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, kao asistent na Katedri za Fiziologiju biljaka. Učestvuje u izvođenju vežbi na predmetima Fiziologija biljaka, Fiziologija rasteća i razvića biljaka, Kultura biljnih ćelija i tkiva, Eksperimentalne metode u fiziologiji biljaka, a učestvovao je i u izvođenju nastave na Hemiskom fakultetu na predmetu Biohemija i fiziologija biljaka.

Učesnik je projekta osnovnih istraživanja koje finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj- broj projekta 173024. Takođe, bio je član projekta u okviru bilateralne saradnje između Republike Srbije i Mađarske - *Ex situ* konzervacija retkih i ugroženih briofita u Mađarskoj, Srbiji i Evropi, kao i međuakadenskog projekta pod nazivom Istraživanje kriptogame flore Balkanskog poluostrva.

Milorad M. Vujičić je član Društva za fiziologiju biljaka Srbije (DFBS) i Federacije evropskih udruženja za biljnu biologiju (FESPB).

# Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милорад М. Вујичић

Број индекса Б3305/2009

## Изјављујем

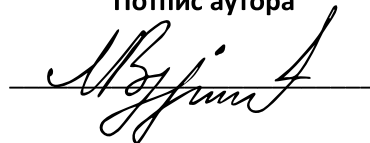
да је докторска дисертација под насловом

Биохемијски и екофизиолошки одговори одабраних врста маховина на контролисани  
стрес изазван солима у аксеничним условима

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

У Београду, 4.8.201

Потпис аутора



# Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милорад М. Вујичић

Број индекса Б3305/2009

Студијски програм Физиологија и молекуларна биологија биљака

Наслов рада Биохемијски и екофизиолошки одговори одабраних врста маховина на контролисани стрес изазван солима у аксеничним условима

Ментори др Анета Сабовљевић и др Марко Сабовљевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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.

У Београду, 4.8.2016.

Потпис аутора  


# Изјава о коришћењу

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

Биохемијски и екофизиолошки одговори одабраних врста маховина на контролисани стрес изазван солима у аксеничним условима

која је моје ауторско дело.

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

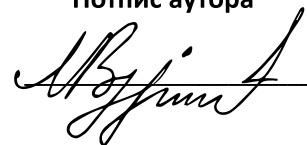
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, \_\_\_\_\_ 4. 8. 2016.

Потпис аутора



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