

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Марија Д. Перић

**Физиолошка и фитохемијска
карактеризација биљака врсте
Rindera umbellata (Waldst. & Kit.) Bunge
гајених *in vitro***

докторска дисертација

Београд, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marija D. Perić

**Physiological and phytochemical
characterization of plant species
Rindera umbellata (Waldst. & Kit.) Bunge
cultivated *in vitro***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

КОМИСИЈА

Ментори:

др Слађана Тодоровић, научни сарадник
Универзитет у Београду
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Душица Јаношевић, доцент
Универзитет у Београду
Биолошки факултет
Институт за ботанику и ботаничка башта „Јевремовац“

Чланови комисије:

др Сузана Живковић, научни сарадник
Универзитет у Београду
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“

др Вук Максимовић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду
Институт за мултидисциплинарна истраживања

Датум одбране: _____

Докторска дисертација је урађена у одељењу за Физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“.

Желим да захвалим:

Својој менторки др Слађани Тодоровић која није губила веру у мене, која је одвојила време и енергију и била ми на располагању за консултације и савете и помогла да рад добије форму и квалитет на захтеваном нивоу.

Својој другој менторки др Душици Јаношевић на иницијативи, пуној подршци, датим сугестијама и укупном позитивном приступу и личном доприносу у дефинисању форме и садржаја рада.

Др Сузани Живковић за уложен труд приликом анализа узорака и пружену сву могућу подршку приликом уобличавања текста.

Др Ани Симоновић за огромно знање и енергију коју је уложила приликом осмишљавања и реализације експеримента за анализу гена укључених у продукцију рузмаринске киселине, као и за знање и вештине које ми је несебично пренела из области молекуларне биологије.

Др Вуку Максимовићу што је установио постојање литоспермичне киселине Б у узорцима и др Данијели Мишић што су заједно развили методе које су ми помогле да урадим квалитативну и квантитативну анализу литоспермичне киселине Б.

Свим колегама са Катедре за физиологију биљака, а нарочито шефу др Златку Гиби, који су ми омогућили да приведем крају писање ове дисертације.

Проф. др Драгољубу Грубишићу, мом покојном ментору који ми је омогућио да радим у његовој лабораторији, на корисним саветима и помоћи. Непроцењиво је искуство било радити са њим.

Проф. др Љубинки Ђулафић која је својом смиреношћу и саветима успела да ме умири и увери у коначан успех.

Свим колегама са ИБИСС за стручну помоћ и пријатну радну атмосферу, пријатељску подршку и разумевању од почетка мог рада. Посебно желим да се захвалим др Славици Дмитровић што ми је уступила објекат истраживања, помагала ми и бодрила ме кад ми је било најтеже и Ghalawenji Nabil- у што је био увек ту када је требало.

Колегама са Хемијског факултета Универзитета у Београда за одређивање пиролизидинских алкалоида.

Својим родитељима који су увек имали поверења у мене, обасипали ме љубављу и храбрењем и били и остали велики ослонац у мом животу. Сестри упућујем искрену захвалност што ми је у сваком аспекту била морална и свака друга подршка и што ме је бодрила и гурала напред.

Свим пријатељима који су искреном вером и подршком хранили мој ентузијазам за радом у науци.

Бесконачну захвалност дугујем свом мужу Милану и деци, Миодрагу и Лари, који су увек имали толеранцију и разумевања за мој рад, и довољно стрпљења и љубави да ми опросте што им нисам посвећивала довољно времена и пажње. Заједно смо успели... Хвала што сте ми омогућили да уђем у свет науке и остварење овог циља. Вама посвећујем овај рад.

Физиолошка и фитохемијска карактеризација биљака врсте

Rindera umbellata (Waldst. & Kit.) Bunge гајених *in vitro*

РЕЗИМЕ

Rindera umbellata је ретка и крајње угрожена биљна врста у Србији. Да би се успоставили протоколи за *ex situ* заштиту и обезбедио материјал за молекуларне и фитохемијске анализе успостављена је *in vitro* култура ове слабо испитане врсте. Оптимизација услова гајења заснивала се на варирању врсте и концентрације угљених хидрата (сахароза, глукоза и фруктоза) и фитохормона (гиберелна и јасмонска киселина) у подлози за гајење. Такође је испитиван утицај наведених регулатора растења на продукцију фармацеутски важних секундарних метаболита.

In vitro растење и развиће биљака врсте *R. umbellata* је под утицајем како врсте, тако и концентрације примењеног шећера. Утврђено је да сахароза представља најбољи извор угљеника за *in vitro* раст, ожиљавање и аклиматизацију биљака, а да су концентрације од 0,3 и 1 M свих примењених шећера инхибиторне. Гиберелна киселина стимулише раст и издуживање стабла ових розетастих биљака, али не утиче значајно на процес ожиљавања. Јасмонска киселина је стимулисала *in vitro* раст и ожиљавање *R. umbellata*, нарочито при нижим концентрацијама и на краткотрајним третманима. Највиша примењена концентрација овог фитохормона (200 μ M) инхибирала је све посматране процесе.

Уочена су значајна варирања у квантитативном и квалитативном садржају секундарних метаболита зависно од начина гајења, фенофазе и тестираног биљног органа. Биљке врсте *R. umbellata* у природним условима синтетишу незасићене и засићене пиролизидинске алкалоиде. Биљке гајене *in vitro* синтетишу веома ниске концентрације искључиво засићених пиролизидинских алкалоида.

Фенолна једињења детектована су у листовима и корену ових биљака. Од фенолних киселина биљке из природе садрже више рузмаринске киселине у надземним деловима, док је садржај литоспермичне киселине Б у кореновима вишеструко већи од количине рузмаринске киселине. Сличан однос садржаја ових једињења запажен је и у биљкама које су гајене у *in vitro* култури. Иако су

највише примењене концентрације сахарозе биле инхибиторне за растење, биљке при овим условима синтетишу највише фенолних једињења, флавоноида и рузмаринске киселине. Гиберелна киселина не утиче на продукцију анализираних фенолних једињења у изданцима, док у кореновима садржај укупних фенолних једињења расте, а флавоноида, рузмаринске киселине и литоспермичне киселине Б опада сразмерно повећању концентрације гиберелне киселине у подлози.

Садржај укупних фенола, флавоноида, литоспермичне киселине Б и рузмаринске киселине мерен у изданцима непосредно након третмана јасмонском киселином зависи од концентрације датог хормона у подлози и од дужине трајања третмана. Након опоравка на подлози без хормона није уочена статистички значајна разлика у продукцији фенолних киселина између контролне групе и третираних изданака. Код већине биљака апликација јасмонске киселине стимулише биосинтезу великог броја секундарних метаболита, укључујући и фенолна једињења. Код врсте *R. umbellata* ефекат јасмонске киселине је краткотрајан и временом се губи. Садржај рузмаринске киселине и литоспермичне киселине Б одређује ниво антиоксидативне активности врсте *R. umbellata*. Биљке сакупљене у природи продукују мање секундарних метаболита и показују мању антиоксидативну активност од биљака гајених *in vitro*.

У узорцима *R. umbellata* потврђена је експресија три специфична гена из фенилаланинске „гране“ биосинтетског пута *RA* (*PAL*, *4CL*, и *SAH*), гена за *NADPH*:цитохром *P450* редуктазу (*CPR*) и гена за цитохром *P450* зависну монооксигеназу (*CYP98A*). У испитиваним узорцима није детектована експресија гена за *TAT*, *HPPR* и *RAS*, тј. ензима друге „гране“ који контролишу пут конверзије *L*-тирозина.

Кључне речи: *Rindera umbellata*, *in vitro*, угљени хидрати, гиберелна киселина, јасмонска киселина, фенолна једињења, антиоксидативна активност, рузмаринска киселина, литоспермична киселина Б, експресија гена.

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Физиологија биљака

УДК број: [582.929:[581.1+577.175.1]]:57.085.2(043.3)

Physiological and phytochemical characterization of plant species *Rindera umbellata* (Waldst. & Kit.) Bunge cultivated *in vitro*

ABSTRACT

Rindera umbellata is a rare and critically endangered plant species in Serbia. In order to optimize protocols for *ex situ* conservation and provide the materials for molecular and phytochemical analysis, a suitable method for *in vitro* propagation of this plant species was established. Optimization of the growing conditions was based on varying the type and concentration of carbohydrates (sucrose, glucose and fructose) and phytohormones (gibberellic acid and jasmonic acid) in the substrate. Furthermore, the effect of selected growth regulators on the production of pharmaceutically important secondary metabolites was investigated.

In vitro growth and development of *R. umbellata* plants were significantly affected by both the type and the concentration of applied sugars. It was found that sucrose is the best carbon source for *in vitro* growth, rooting and acclimatization of the plants, and that the concentrations of 0.3 and 1 M of all applied sugars had an inhibitory effect. Gibberellic acid stimulated growth and stem elongation, but did not significantly affect the process of rooting. Jasmonic acid stimulated *in vitro* growth and rooting of *R. umbellata*, especially at lower concentrations, and after short-term treatments.

Significant variations in quantitative and qualitative contents of secondary metabolites are noticed, which depended on the method of cultivation, growth stages and plant organs tested. Plants of *R. umbellata* grown under natural conditions synthesized both unsaturated and saturated pyrrolizidine alkaloids. *In vitro* grown plants synthesized a very low concentration of saturated alkaloids.

Phenol compounds were detected in the leaves and roots of the plants. The content of lithospermic acid B in the roots was several times greater than the amount of rosmarinic acid. A similar relation between the contents of rosmarinic acid and lithospermic acid B was observed in plants that were grown *in vitro*. Gibberellic acid did not affect the production of phenolic compounds in the shoots. However, total phenol content in roots increased, while the concentration of flavonoids, rosmarinic acid

and lithospermic acid B decreased in relation to increasing concentrations of gibberellic acid.

Total phenolics, flavonoids, lithospermic acid B, and rosmarinic acid content was measured in shoots immediately after the treatment and depended on both, the concentration of the phytohormones in the medium and the treatment duration. After growth recovery on medium without phytohormones there was no statistically significant difference in the production of phenolic acids between the control group and the treated plants. Although the application of jasmonic acid stimulates the biosynthesis of a large number of secondary metabolites, including phenolic compounds, in *R. umbellata* jasmonic acid effect was transient.

Wild grown plants produced fewer amounts of secondary metabolites and exhibited a lower antioxidant activity than plants grown *in vitro*. The endogenous level of rosmarinic acid and lithospermic acid B determines the antioxidant activity of *R. umbellata*.

In *R. umbellata* samples it was confirmed the expression of three genes from phenylalanine "branch" of rosmarinic acid biosynthetic pathway (PAL, 4CL and CAH), the gene for NADPH: cytochrome P450 reductase (CPR) and the gene for cytochrome P450-dependent monooxygenase (CYP98A). However, in all the samples tested it was not confirmed gene expression of enzymes from the second "branch", that control the time of conversion of L-tyrosine, namely TAT, HPPR and RAS.

Key words: *Rindera umbellata*, *in vitro*, carbohydrates, gibberellic acid, jasmonic acid, phenol compounds, antioxidant activity, rosmarinic acid, lithospermic acid B, gene expression.

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Plant physiology

UDC number: [582.929:[581.1+577.175.1]]:57.085.2(043.3)

САДРЖАЈ

СКРАЋЕНИЦЕ	1
1 УВОД	1
1.1. Пропагација биљака у условима <i>in vitro</i>	1
1.1.1. Оптимизација услова гајења	3
1.1.1.1. Угљени хидрати – неопходни фактори растења у култури <i>in vitro</i> 3	
1.1.1.1.1. Сахароза.....	4
1.1.1.1.2. Глукоза.....	7
1.1.1.1.3. Фруктоза	8
1.1.1.2. Фитохормони.....	9
1.1.1.2.1. Ауксини	10
1.1.1.2.2. Цитокинини.....	10
1.1.1.2.3. Гиберелини.....	11
1.1.1.2.4. Јасмонати.....	12
1.2. Аклиматизација биљака.....	13
1.3. Секундарни метаболити	14
1.3.1. Улога елицитора у продукцији секундарних метаболита <i>in vitro</i>	15
1.3.2. Пиролизидински алкалоиди.....	16
1.3.3. Фенолна једињења	17
1.3.3.1. Флавоноиди.....	19
1.3.3.2. Рузмаринска киселина	21
1.3.3.2.1. Пут биосинтезе рузмаринске киселине	22
1.3.3.3. Литоспермична киселина Б.....	25
1.3.3.3.1. Пут биосинтезе литоспермичне киселине.....	26
1.4. Оксидативни стрес	27
1.4.1. Антиоксидативни механизми заштите.....	28
1.4.2. Антиоксидативна активност фенолних једињења	29
1.5. <i>Rindera umbellata</i> (Waldst. & Kit.) Bunge – класификација, ботаничке.....	
карактеристике и распрострањеност	30
2 ЦИЉ РАДА	34
3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	35

3.1. Биљни материјал.....	35
3.2. Састав хранљивих подлога	35
3.3. Површинска стерилизација биљног материјала	37
3.4. Услови гајења култура и експериментални дизајн.....	37
3.5. Аклиматизација биљака на услове стакларе и поља	38
3.6. Екстракција пиролизидинских алкалоида.....	38
3.7. <i>GC-MS</i> анализа пиролизидинских алкалоида	39
3.8. Екстракција фенолних једињења	39
3.9. Спектрофотометријско одређивање количине укупних слободних фенола...	40
3.10. Квантитативна и квалитативна <i>HPLC-DAD</i> анализа садржаја фенолних.... једињења у метанолним екстрактима <i>R. umbellata</i>	40
3.11. Квалитативна и квантитативна <i>UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS</i> анализа (Течна хроматографија под ултра високим притиском са <i>UV</i> детекцијом и <i>MS/MS</i> масеном спектрофотометријом) садржаја фенолних једињења уметанолним екстрактима биљака из природе и <i>in vitro</i>	42
3.12. Одређивање количине флавоноида	44
3.13. Одређивање антиоксидативне активности	44
3.13.1. <i>DPPH</i> метода.....	45
3.13.2. <i>ABTS</i> метода.....	46
3.14. Идентификација гена из пута биосинтезе рузмаринске киселине	47
3.14.1. Дизајнирање прајмера за изолацију гена из пута биосинтезе	47
рузмаринске киселине	47
3.14.2. Изолација РНК	50
3.14.3. Квантификација РНК.....	51
3.14.4. Одређивање квалитета РНК.....	51
3.14.5. Третман дезоксирибонуклеазом.....	52
3.14.6. Реакција реверзне транскрипције (<i>RT</i>) – синтеза првог ланца	52
3.15. Оптимизација <i>PCR</i> протокола.....	53
3.15.1. Оптимизација температуре спаривања прајмера (<i>Ta – annealing</i>) за... <i>PCR</i>	53
3.15.2. Оптимизација <i>PCR</i> применом адитива	55

3.16. Припрема биљног материјала за светлосну микроскопију парафинска метода)	55
3.17. Статистичка обрада података и приказивање резултата	56
4 РЕЗУЛТАТИ.....	57
4.1. Морфогенеза незрелих зиготских ембриона <i>Rindera umbellata in vitro</i>	57
4.1.1. Успостављање <i>in vitro</i> културе	57
4.1.2. Индукција појаве адвентивних и аксиларних пупољака.....	58
4.1.3. Ефекат угљених хидрата на морфогенезу и растење адвентивних..... изданака	63
4.1.4. Ефекат GA_3 на морфогенезу и растење адвентивних изданака.....	66
4.1.5. Ефекат JA на морфогенезу и растење адвентивних изданака	70
4.2. Ожиљавање изданака	75
4.3. Аклиматизација биљака.....	84
4.4. Продукција секундарних метаболита.....	85
4.4.1. Анализа садржаја пиролизидинских алкалоида	87
4.4.2. Анализа садржаја фенолних једињења	88
4.4.2.1. Утицај различитих угљених хидрата на продукцију фенолних..... једињења <i>in vitro</i>	91
4.4.2.2. Утицај GA_3 на продукцију фенолних једињења <i>in vitro</i>	99
4.4.2.3. Утицај JA на продукцију фенолних једињења <i>in vitro</i>	104
4.5. Антиоксидативна својства биљака из природе и биљака гајених <i>in vitro</i>	111
4.5.1. Ефекат угљених хидрата	112
4.5.2. Ефекат GA_3	114
4.5.3. Ефекат JA	115
4.6. Оптимизација <i>PCR</i> протокола са прајмерима за <i>qPCR</i>	117
5 ДИСКУСИЈА.....	122
5.1. Успостављање оптималних услова за <i>in vitro</i> раст <i>R. umbellata</i>	122
5.1.1. Сахароза је најбољи извор угљеника за <i>in vitro</i> раст <i>R. umbellata</i> .	123
5.1.2. GA_3 стимулише издуживање розетастих биљака <i>R. umbellata</i>	126

5.3.1.	Ниже концентрације <i>JA</i> стимулишу раст и ожиљавање биљака <i>R. umbellata</i>	127
5.2.	Аклиматизација биљака <i>R. umbellata</i> на услове стакларе и поља	128
5.3.2.	Садржај секундарних метаболита у биљкама <i>R. umbellata</i>	129
5.3.1.	Квантитативни и квалитативни садржај <i>PA</i> зависи од услова гајења . <i>R. umbellata</i>	131
5.3.2.	<i>R. umbellata</i> - потенцијални извор <i>RA</i> и <i>LAB</i>	132
5.3.	Антиоксидативна активност <i>R. umbellata</i>	136
5.4.	Експресија гена биосинтетског пута <i>RA</i> у <i>R. umbellata</i>	138
6	ЗАКЉУЧЦИ	141
7	ЛИТЕРАТУРА	143
	БИОГРАФИЈА АУТОРА	172

Прилог 1.

Прилог 2.

Прилог 3.

Прилог 4.

СКРАЋЕНИЦЕ

ABTS - 2,2-азинобис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)

•*OH* – хидроксил радикал

1O_2 – синглет кисеоник

2,4-D - 2,4-дихлорфеноксисирћетна киселина

4C-DHPL 3H- 4-кумароил -3',4'- дихидроксифениллактат 3- хидроксилаза

4CL - 4-кумарат-СоА лигаза

4C-pHPL 3H, *4C-pHPL 3H'* – 4-кумароил -4' хидроксифениллактат 3/3'- хидроксилаза

APX – аскорбат пероксидаза

ArO' - фенол радикал

Ar-OH - фенолно једињење

ArOH⁺ - катјонски радикал

BAP – бензил-6-аминопурина

BSA (bovine serum albumin) – говеђи албумински серум

C4H - транс-цинамат-4-хидроксилаза

Caf-pHPL 3'H – кафеоил-4'-хидроксифениллактат 3'-хидроксилаза

CAH – транс-цинамат-4-хидроксилаза

CAT (catalase) – каталаза

cDNA (complementary DNA) – комплементарни ланац ДНК

CID (collision-induced dissociation) - дисоцијација молекула индукована колизијом

CINV - цитоплазматична/ плазмид/ митохондријалана инвертаза

CPR - *NADPH*:цитохром *P450* редуктаза

CWINV - инвертаза ћелијског зида

CYP98A - цитохром *P450* зависна монооксигеназа

DAD (diode array detector) – тип *UV/VIS* детектора за *HPLC*

DEPC (diethylpyrocarbonate) - диетилпирокарбонат

DHPL - 3,4-дихидроксифенилмлечна киселина

DMSO – диметил сулфоксид

DNA (deoxyribonucleic acid) – дезоксирибонуклеинска киселина

ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина

dNTP – смеша дезоксирибо нуклеотида

DPPH - 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил

DW (*dry weight*) – сува маса

EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) – етилендиаминтетрасирћетна киселина

EI - електронски масени спектар

ERA – еквивалент рузмаринске киселине

ERE – еквивалент рутин хидрата

FAA (*Formalin- Acetic Acid-Alcohol*) - фиксатив

FC (*Folin-Ciocalteu*) – Фолин - Чикаљтеу

FID - пламено јонизујући детектор

Fru – фруктоза

FS (*full scan*) – тип (модалитет) скенирања

FW (*fresh weight*) – свежа маса

GA - гиберелини

GA₃ – гиберелна киселина

GC-MS - гасна хроматографија са масеном спектрометријом

Glc (*glucose*) – глукоза

GPX – глутатион пероксидаза

GR – глутатион редуктаза

HIV (*human immunodeficiency virus*) – вирус хумане имунодефицијенције

HO₂[•] – перхидрокси радикал

HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) – течна хроматографија под високим притиском

HPPR - 4-хидроксифенилпируват редуктаза

IAA – индол-3-сирћетна киселина

IBA - индолбутерна киселина

IC₅₀ - ефикасна концентрација антиоксиданса потребна да смањи почетну концентрацију слободних радикала за 50%

Inv – инвертаза

JA (*jasmonic acid*) - јасмонска киселина

KIN - кинетин

LAB (*lithospermic acid B*) - литоспермична киселина Б

LSD (*least significant difference*) – најмања статистички значајна разлика

MeJA - метил-јасмонска киселина

MS - масена спектрофотометрија

MC - *Murashige & Skoog* хранљива подлога са 0,7% агара

NAA - нафтилсирћетна киселина

NADH - коензим никотинамид аденин динуклеотид

NADPH – коензим никотинамид аденин динуклеотид фосфат

NLS (neutral loss scanning) – анализа парова јона који се не разликују у карактеристичним неутралним масама

O_2^{\bullet} – супероксидни анјон радикал

O_3 – озон

PA (pyrrolizidine alkaloids) - пиролизински алкалоиди

PAL - фенилааланин амонијум лијаза

PANS (nonsaturated pyrrolizidine alkaloids) - незасићени пиролизински алкалоид непознате структуре

PAS (saturated pyrrolizidine alkaloids) - засићени пиролизински алкалоид непознате структуре

PCR (Polymerase Chain Reaction) – реакција ланчаног умножавања

pHPP - 4- хидрокси-фенилпируват

PIS (product ion scanning) - анализа одабраних јона прекурсора

qPCR (quantitative PCR) – квантитативни *PCR*

R^{\bullet} - слободни радикал

RAS - “синтаза рузмаринске киселине” - хидроксицинамоил -*CoA*: хидроксифениллактат-хидроксицинамоилтрансфераза

RE (rutin hydrate) - еквивалент рутин хидрата

RHK – рибонуклеинска киселина

RO^{\bullet} – алкоксил радикал

ROS – (*reactive oxygen species*) реактивне врсте кисеоника

Rt – ретенционо време

RT (reverse transcription) – реверзна транскрипција

RA (rosmarinic acid) – рузмаринска киселина

SOD – супероксид дисмутаза

SPP - сахарозо-фосфатаза

SPS - сахарозо-фосфат синтаза

SRM (selected reaction monitoring) - најосетљивији тип анализе који се користи за апсолутну квантификацију

Suc – сахароза

SUSY - сахарозо синтаза

Ta (annealing) – температура спаривања прајмера

TAT - тирозин аминок-трансфераза

TBE – трис – боратни - *EDTA* пуфер

UDP- глюкоза - уридин дифосфат глюкоза

UDPGlc – уридин дифосфат глюкоза

UHPLC (Ultra High Pressure Liquid Chromatography) – течна хроматографија под ултра високим притиском

UV/VIS – ултраљубичасти/ видљиви део спектра

UTP - уридин трифосфат

VINV - вакуоларна инвертаза

1 УВОД

Током еволуције биљке су усавршавале стратегије које су им омогућавале да на стимулусе из спољашње средине адекватно реагују, најчешће модификацијом метаболизма. С обзиром да су биљке сесилни организми и да нису у могућности да избегну утицаје који их окружују, прилагођавање темпа растења и развића у складу са условима спољашње средине омогућило им је опстанак и остављање потомства.

Активности људи доводе до брзих промена у спољашњој средини које су често изван адаптивних опсега многобројних организама, тако да они нису у стању да се прилагоде новонасталим условима. Нагле и велике промене околине доводе до свакодневног нестајања великог броја биљних и животињских врста, као и целих природних екосистема.

Ради свеобухватне заштите угрожених биљних врста развијене су методе *in situ* и *ex situ* заштите, реинтродукције и интродукције врста. У случају неуспеха предузетих мера губи се генотип који никада више не може да се врати у светски генофонд, оригиналност коју је еволуција обликовала хиљадама или милионима година, а чију вредност наука најчешће није ни успела да спозна (Stevanović и сар., 2006).

Овај рад је допринос *ex situ* заштити једне од најугроженијих биљних врста Србије - *Rindera umbellata* (Waldst. & Kit.) Bunge.

1.1. Пропагација биљака у условима *in vitro*

Веgetетивно размножавање је одлика биљака по којој се оне битно разликују од животиња. Биљке су способне да из одсеченог органа као што је лист, стабло или корен, као и из мањег фрагмента, регенеришу остатак биљног организма захваљујући тотипотентности ћелија (Haberlandt, 1902). Способност дедиференцијације и редиференцијације биљних ћелија *in vitro* омогућава регенерацију ткива, органа или читавог организма (Граfi, 2004). Веgetативним размножавањем се добија велики број нових генетички идентичних биљака. Идеју да се искористе ове способности биљних ћелија и омогући расветљавање

механизама који контролишу и усмеравају растење и развиће биљног организма први је дао *Gottlieb Haberlandt* (1902). Тако су се развиле технике за гајење ћелија, ткива и органа у стерилним, строго контролисаним физичким (светлост, температура и влажност ваздуха) и хемијским (дефинисан хемијски састав подлога за гајење) условима. Скуп датих техника назива се *in vitro* култура ћелија, ткива и органа (*Bhojwani & Razdan*, 1996).

За успостављање културе *in vitro* као експлантати могу да послуже сви делови биљке: од ембриона, преко делова клијанаца - корена, котиледона, епикотила и хипокотила (код дикотила), односно мезокотила и колеоптила (код монокотила) и свих делова одрасле биљке, укључујући листове, лисне петељке и делове цвета (*Simonović*, 2011).

Култура изданака или микропропагација у ужем смислу је техника у којој се гаје искључиво изданци стабла осовинског порекла, вршни и пазушни пупољци. Техника се заснива на клонском умножавању изданака. Процес микропропагације се обично дели у четири фазе: успостављање културе, умножавање изданка, оживљавање и адаптација тј. аклиматизација у стаклари (*Simonović*, 2011). Посебна варијанта је култура меристема, где је за добијање безвирусних биљака довољно мање од 0,1 mm вршног меристема пупољка (*Vinterhalter & Vinterhalter*, 1996).

Клонско *in vitro* размножавање или микропропагација у ширем смислу подразумева било који начин размножавања у коме је потомство генетички идентично полазном материјалу и обухвата: микропропагацију, органогенезу и соматску ембриогенезу (*Simonović*, 2011).

Код биљака код којих је отежано клијање семена, услед недовољне развијености ембриона, за успостављање *in vitro* културе могу се користити незрели ембриони. Ово је прва *in vitro* техника која је нашла комерцијалну примену у размножавању орхидеја (*Vinterhalter & Vinterhalter*, 1996). Култура ембриона се дуго година користи за испитивање физичких и нутритивних услова неопходних за развиће ембриона, за превазилажење дорманције семена, скраћење циклуса размножавања и гајења, тестирање вијабилности семена, добијање материјала неопходног за микропропагацију и спасавање незрелих

хибридних ембриона у случајевима инкомпатибилног укрштања (*Hu & Wang, 1986*). Ова метода се користи и за добијање одговарајућег материјала за генетичку трансформацију (*Varshney & Johnson, 2010*) као и за ефикаснију *in vitro* регенерацију изданака (*Pal и сар., 2012; Sancak и сар., 2000*).

In vitro гајење не захтева велики простор, а експериментални материјал је лако доступан и истог квалитета током целе године. Применом ове технике битно се смањује притисак на самоникле популације биљака и омогућава добијање биљног материјала ослобођеног вируса и патогена (*Hussain и сар., 2012*).

1.1.1. Оптимизација услова гајења

Многи фактори попут угљених хидрата, регулатора растења, кисеоника и угљен диоксида, температуре и фотопериода, контролишу ћелијски раст и продукцију (*Murthy и сар., 2008*). Успостављање протокола за *in vitro* пропацију неистражених врста подразумева успостављање оптималних услова неопходних за растење и развиће биљака.

1.1.1.1. Угљени хидрати – неопходни фактори растења у култури *in vitro*

Угљени хидрати играју важну улогу у животу биљака, не само као градивни молекули и извор енергије, већ и као регулаторни молекули (*Roitsch, 1999; Wind и сар., 2010*). Сахароза и глукоза имају кључну улогу у контроли експресије гена повезаних са метаболизмом, отпорношћу на стрес, растом и развићем биљака (*Mohamed & Alsadon 2010; Rolland и сар., 2006; Smeekens, 2000; Todorović и сар., 2006*).

Метаболизам угљених хидрата је веома динамичан процес и метаболички флуksеви и садржај угљених хидрата се мењају током развића биљке. Ове промене могу бити под ендогеним утицајем, као и под утицајем спољашњих сигнала, попут дужине дана и осталих биотичких и абиотичких стимулуса (*Rolland и сар., 2006*).

Затворен *in vitro* систем има ограничену количину CO_2 , а синтеза и квалитет доступне светлости је низак те биљка није увек у стању да фотосинтезише. Да би се ова ограничења превазишла, у подлогу за гајење биљака се, као извор угљеника и енергије, додају угљени хидрати (Hazarika, 2003). На тај начин се различити олиго - и дисахариди у биљкама лако конвертују и укључују у метаболизам.

Додавање осмотски активних раствора у подлогу уместо угљених хидрата показало је да су шећери, поред тога што су извори угљеника, и регулатори осмотског потенцијала (de Paiva Neto & Otoni, 2003). Захваљујући насталом осмотском потенцијалу угљени хидрати регулишу усвајање осталих компоненти из подлоге и усмеравају раст култура *in vitro* (Nowak и сар., 2004; Sghaier и сар., 2009). Осморегулација и растење су нераскидиво повезани. Висок осмотски потенцијал подлоге може довести до инхибиције растења и смањења свеже масе (Wachira, 1997). Са повећавањем концентрације угљених хидрата у подлози опада водни потенцијал подлоге тако да биљке нису у могућности да усвоје довољно воде, нарочито када водни потенцијал подлоге постане нижи од водног потенцијала у ткивима.

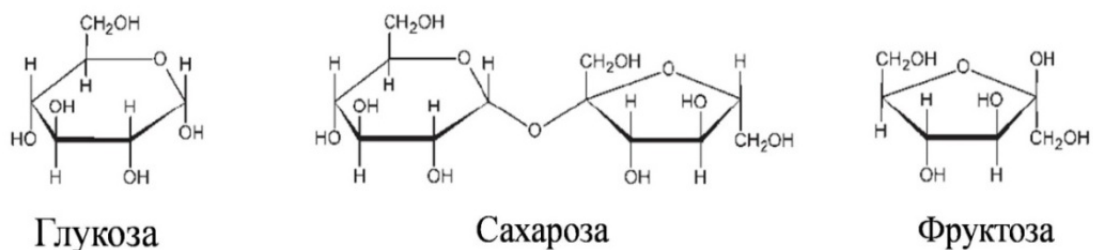
Имајући у виду ове чињенице, као и бројне податке из литературе који указују на то да различитим биљним врстама за растење и развиће не морају да одговарају исти извори угљених хидрата, важно је да се на самом почетку успостављања *in vitro* културе дате биљне врсте одабере одговарајућа врста шећера и одреди оптимална концентрација за раст и развиће.

У култури *in vitro* најчешће коришћен угљени хидрат је сахароза у концентрацијама од 2 - 3%. Осим сахарозе, користе се и њене конститутивне хексозе: глукоза и фруктоза (Vinterhalter & Vinterhalter, 1996)

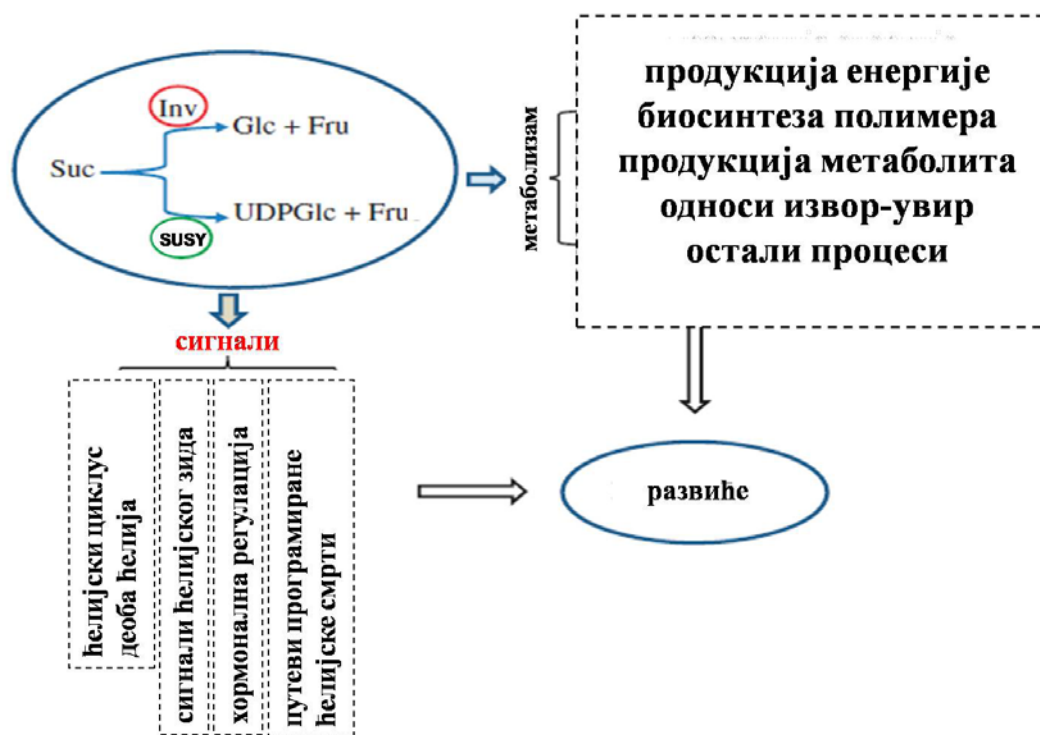
1.1.1.1.1. Сахароза

Сахароза (β -D-фруктофуранозил-(2→1)- α -D-глюкопиранозид) је за биљке најважнији дисахарид трехалозног типа, састављен од молекула глукозе и фруктозе (Слика 1). Представља најважнији транспортни облик шећера у биљци. Сахароза такође активира сигналне путеве који утичу на генску експресију, која

доводи до физиолошких адаптација биљака (Слика 2; Wind и сар., 2010; Tognetti и сар., 2013; Ruan, 2012).

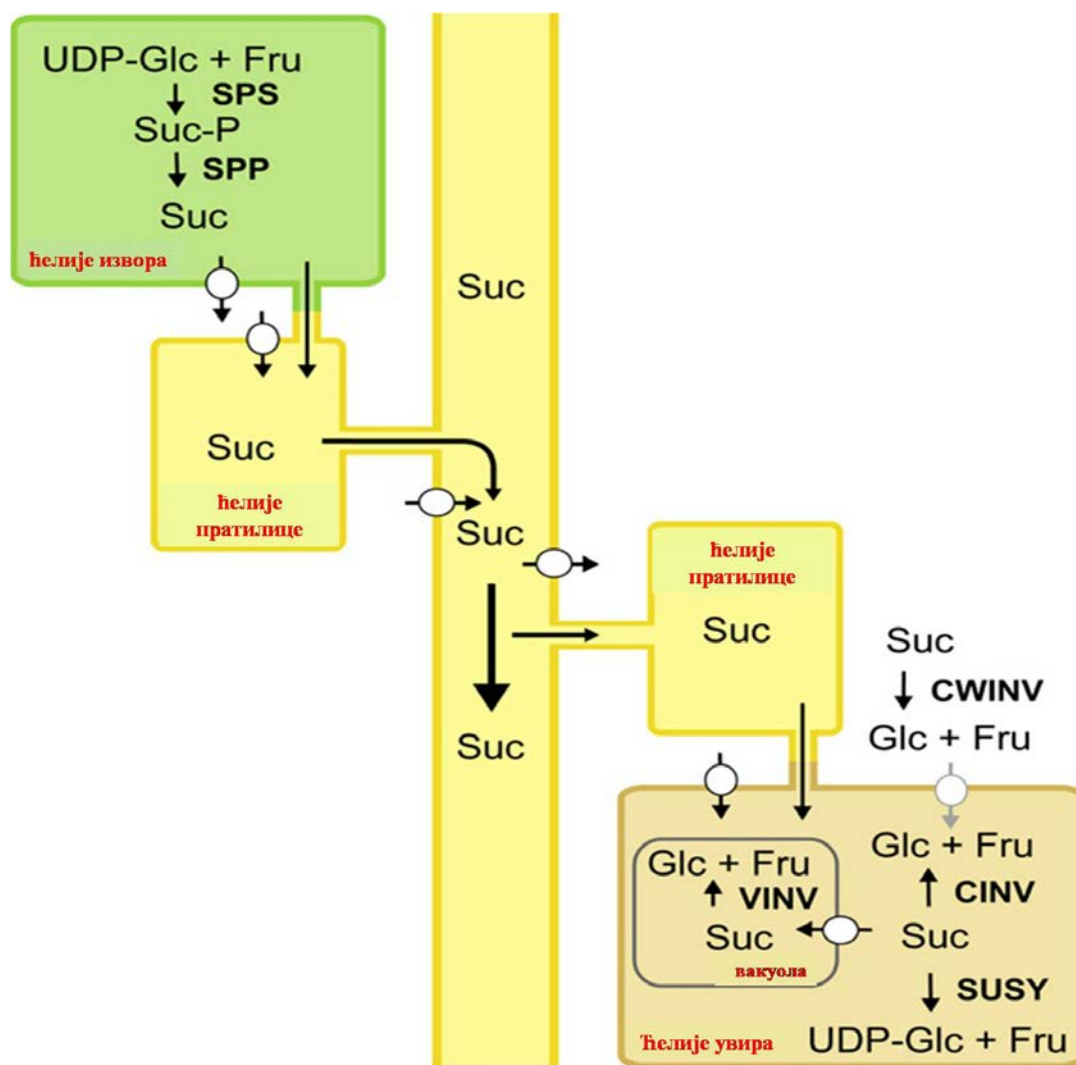


Слика 1 Структурне формуле глукозе, сахарозе и фруктозе



Слика 2 Модел сигналних улога деградације сахарозе у развићу упоредо са њеним функцијама у метаболизму (метаболити и реакције разлагања могу имати сигналну улогу у многим аспектима развића). *Inv* –инвертаза, *Glc* – глукоза, *UDPGlc* – *UDP* – глукоза, *Fru* – фруктоза, *Suc* –сахароза и *SUSY*- сахарозна синтаза (Модификовано према Ruan, 2012)

Сахароза се у цитосолу синтетише у процесу фотосинтезе (Слика 3). Може бити катаболисана у цитоплазми (Barratt и сар., 2009), митохондријама (Szarka и сар., 2008), хлоропластима (Gerrits и сар., 2001) и вакуолама (Sonnewald и сар., 1991; Grennan & Gragg, 2009). У цитоплазми сахарозна синтаза (*SUSY*) катализује разлагање сахарозе помоћу уридин трифосфата (*UTP*) на *UDP*-глукозу и фруктозу (Слика 3). Експлантати могу да ослободе инвертазе у подлогу, где оне катализују конверзију сахарозе на глукозу и фруктозу (Wind и сар., 2010).



Слика 3 Процеси синтезе, транспорта и разлагања сахарозе. ћелије извора - ћелије где се синтетише сахароза; *Suc* - сахароза; *Fru* - фруктоза; *Glc* - глукоза; *UDP-Glc* - *UDP* - глукоза; *SPP* - сахарозо-фосфатаза; *SPS* - сахарозо-фосфат синтаза; *SUSY* - сахарозо синтаза; *CWINV* - инвертаза ћелијског зида; *VINV* - вакуоларна инвертаза; *CINV* - цитоплазматична/ плазмид/ митохондријалана инвертаза (модификовано према Wind и сар., 2010).

Контролисањем нивоа синтезе, транспорта и метаболизма сахарозе може се утицати на раст, развиће и физиологију биљака, као и на синтезу резервних супстанци (*Wind* и сар. 2010).

Биљке могу да детектују ниво растворених угљених хидрата у ћелији, њихов флуks кроз плазма мембрану, као и ниво шећера који је укључен у процес гликолизе, захваљујући сензорима хексоза и дисахарида (*Loreti* и сар., 2001).

Сахароза је обично најбољи извор угљеника за раст *in vitro* култура пошто је најзаступљенији шећер који се транспортује кроз флоем (*Faure* и сар., 1998; *Gertlowski & Petersen*, 1993; *Marino* и сар., 1993; *Sharma* и сар., 2008; *Wachira*, 1997). Приликом гајења *in vitro* примећено је да долази до бољег оживљавања биљака на подлогама са сахарозом код врста *Anagallis arvensis* (*Silvente & Trippi*, 1986), *Prunus armeniaca* (*Marino* и сар., 1993) и јабуке, култивар Jork 9 (*Pawlicki & Welander*, 1995), а да је раст изданака (издуживање интернодија) инхибиран високим концентрацијама сахарозе у подлози код врсте *Anagallis arvensis* (*Silvente & Trippi*, 1986). Показан је позитиван утицај сахарозе на формирање аксиларних пупољака врсте *Centaureum pulchellum* (*Todorović* и сар., 2006) и повећану продукцију секундарних метаболита. У суспензији ћелија врсте *Coleus blumei* сахароза утиче на вишеструко повећану продукцију рузмаринске киселине (*Gertlowski & Petersen*, 1993), а код врсте *Arabidopsis thaliana* на продукцију антоцијанина (*Solfanelli* и сар., 2006).

1.1.1.1.2. Глукоза

Глукоза је по свом саставу хексоза и има особине редукујућег шећера. Она је најраспрострањенији моносахарид и у природи се јавља у облику изомера који се зове декстроza или грозђани шећер. Улази у састав сахарозе, целулозе и скроба. Има слadak укус и растворљива је у води. Поређењем ефекта глукозе и фруктозе на растење *in vitro* култура уочено је да глукоза има већи ефекат на раст биљака (*Harada & Murai*, 1996; *Cuenca & Vieitez*, 2000). Код биљака које се тешко оживљавају, попут врста *Eucalyptus globulus* (*Corrêa* и сар., 2005) и *Bambusa nutans*

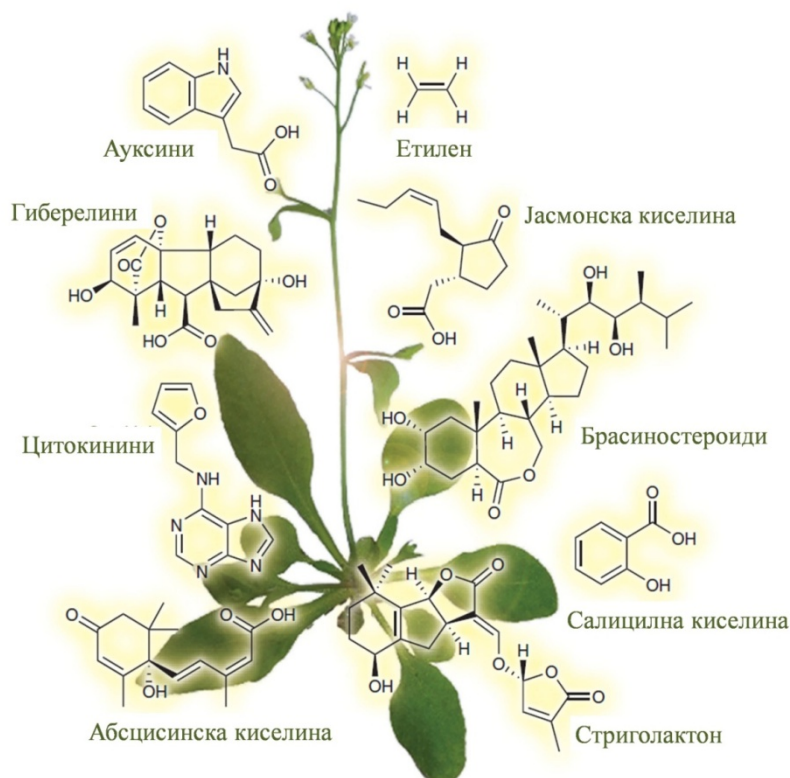
(Yasodha, 2008) глукоза индукује појаву и до 89% коренова. Присуство глукозе у иницијалној фази образовања коренских примордија може да усмери више ћелија ка индукцији коренова побољшавајући ожиљавање (Corrêa и сар., 2005). Позитивни ефекти глукозе на ожиљавање забележени су још код јабуке (Moncousin и сар., 1992) и *Nepeta rtanjensis* (Mišić и сар., 2005a). Код врсте *Quercus suber* повећање концентрације глукозе у подлози условљава повећање броја кратких збијених изданака, проценат ожиљавања, као и број коренова по експлантату (Romano и сар., 1995; Belaizi & Boxus, 1995). Глукоза у односу на сахарозу условљава појаву већег броја дужих изданака код врсте *Corylus avellana* (Yu & Reed, 1993), а повећану пролиферацију код врсте *Prunus tume* (Harada & Murai, 1996). Пупољци врсте *Phoenix dactylifera* гајени на подлогама са глукозом имају већу суву масу у односу на оне гајене на сахарози (Al-Khateeb, 2008). У биореакторима од 300 литара са аерацијом и додатком 8% (w/v) глукозе достигана је максимална продукција дигоксина код врсте *Digitalis lanata* (Kreis & Reinhard, 1992).

1.1.1.1.3. Фруктоза

Фруктоза спада у групу моносахарида. Позната је под називом воћни шећер. По свом саставу је хексоза и, као и глукоза, спада у редукујуће шећере. D - фруктоза је кетоза која се назива још и левулоза. Налази се слободна у воћу и меду, а улази у састав дисахарида сахарозе. Фруктоза у ретким случајевима потпомаже растење култура изданака боље од сахарозе. То је случај са *Carica papaya* L. (Drew и сар., 1993) и *Juglans regia* L. (Gruselle и сар., 1995). У случају врсте *Prunus cerasus* L. приликом гајења *in vitro* фруктоза индукује издуживање изданака, али смањује пролиферацију (Bozена & Szczerba, 1991). Фруктоза стимулише развој цвасти код бугенвилије (Steffen и сар., 1988), док у регенерантима банане снижава садржај хлорофила и водни потенцијал у листовима и тиме смањује интензитет фотосинтезе (Buah и сар., 2000). Под утицајем фруктозе смањен је дијаметар, маса и садржај хексоза у малим зрнима *Vitis vinifera* гајеним 2 месеца у култури (Pérez и сар., 2000).

1.1.1.2. Фитохормони

Регулатори растења природног порекла или фитохормони су једињења која не спадају у хранљива једињења, имају малу молекулску масу и у веома ниским концентрацијама обављају специфичне регулаторне функције. Они стимулишу, инхибирају или на други начин модификују растење и развиће биљака. Представљају елементе сигналног система који усклађују функције биљке са битним чиниоцима њене околине, учествујући и у одговорима на абиотички и биотички стрес (Glaiser и сар., 2014). Обухватају неколико класа једињења која се разликују како по хемијским својствима, тако и по физиолошком дејству (Слика 4). Главне класе фитохормона које се користе у култури *in vitro* су: ауксини, цитокинини, гиберелини, абсцисинска киселина и етилен (Slater и сар., 2003). У фитохормоне спадају и јасмонати, брасиностероиди, олигосахарини и полиамини (Nešković и сар., 2010).



Слика 4 Фитохормони (класе и основна структура; модификовано према Santner и сар., 2009).

1.1.1.2.1. Ауксини

Сам назив ауксини потиче од грчке речи *αυξεν* (*auxein*), што значи расти, повећавати. Ови есенцијални фитохормони су по својој структури углавном индолна једињења. Ауксини учествују у бројним развојним процесима и имају мноштво различитих функција. Основне функције ауксина су:

- заједно са цитокининима регулишу ћелијски циклус и деобу ћелија,
- стимулишу издуживање ћелија стабла и колеоптила,
- индукују појаву адвентивних коренова и имају главну улогу у апикалној доминацији, тако што учествују у корелативној инхибицији мирујућих пупољака.

Због интеракција са другим хормонима у сложеним хормоналним комплексима који регулишу све аспекте развића биљака тешко је пратити њихове функције изоловано (*Nešković* и сар., 2010). Главни природни ауксин је индол-3-сирћетна киселина (*IAA*). Поред природних ауксина постоје и синтетички: 1- нафтилсирћетна киселина (*NAA*), 2,4-дихлорфеноксисирћетна киселина (*2,4-D*) и индолбутерна киселина (*IBA*). Ови хормони се због своје улоге у деоби ћелија користе као стимулатори у култури *in vitro* (*Slater* и сар., 2003). У култури *in vitro* ауксини се најчешће користе за индукцију адвентивних коренова. Они стимулишу појаву адвентивних коренова, а затим инхибирају њихово издуживање, па се обично примењује двостепено ожиљавање, тј. каснији пренос ожиљених изданака на подлогу без хормона. За индукцију адвентивних коренова најчешће се користе *IBA* и *NAA*. За мултипликацију изданака користе се ниске концентрације ауксина. Како стимулишу ћелијске деобе у неорганизованом ткиву, ауксини се користе за индукцију и образовање калуса. (*Vinterhalter & Vinterhalter*, 1996).

1.1.1.2.2. Цитокинини

Цитокинини, есенцијални биљни хормони, по својој структури су деривати пуринске базе аденина. Основне физиолошке функције су им:

- регулација ћелијског циклуса и стимулација ћелијских деоба,
- укидање апикалне доминације,

- ретенција хлорофила и одлагање старења листова,
- индукција формирања *de novo* пупољака и стимулација растења мирујућих пупољака,
- усмеравање транспорта и акумулације асимилата у органима богатим цитокининима.

У *in vitro* култури користе се зеатин и 2-изопентил аденин, а од синтетичких аналога кинетин (*KIN*) и бензил-6-амино пурин (*BAP*) (*Slater* и сар., 2003). За микропропагацију најважнији ефекат цитокинина је укидање апикалне доминације стабла, чиме је омогућено издуживање аксиларних пупољака у пазуху листова. Као антагонисти ауксина, цитокинини спречавају формирање и раст адвентивних коренова. Осим тога, цитокинини утичу и на диференцијацију изданака из калуса (*Vinterhalter & Vinterhalter*, 1996).

1.1.1.2.3. Гиберелини

Гиберелини су по хемијској структури дитерпенска једињења са 19 и 20 C атома. Име су добили јер су откривени као продукти гљиве *Gibberella fujikuroi* која код пиринча изазива прекомерно издуживање стабла (*Curtis & Cross*, 1954). Сви гиберелини имају ознаку *GA* са одговарајућим редним бројем. До 2003. године је изоловано 136 гиберелина (*Piotrowska & Bajguz*, 2011), али немају сви физиолошку улогу у биљкама (*Bömke & Tudzynski*, 2009).

Основне функције гибрелина су:

- стимулација издуживања стабла,
- стимулација клијања позитивно фотобластичних семена
- синтеза и секреција хидролитичких ензима при клијању семена
- индукција цветања током вернализације и фотопериодизма (*Nešković* и сар., 2010).

У култури *in vitro* гиберелини немају специфичну функцију. У зависности од концентрације гиберелини могу да инхибирају ризогенезу (*Vinterhalter & Vinterhalter*, 1996). Додавање *GA* у подлогу за гајење може да повећа антиоксидативни потенцијал и продукцију секундарних метаболита (*Jaleel* и

сар., 2007). Ниске концентрације егзогено додате GA_3 могу битно да повећају одбрамбене способности биљке (*Jaleel* и сар., 2007).

1.1.1.2.4. Јасмонати

Јасмонати су деривати (-) - јасмонске киселине (*JA*) и изомерне (+) –7–изојасмонске киселина. Основне функције јасмоната су :

- инхибиција деобе и издуживања ћелија, и стимулација експанзије (*Miyamoto* и сар., 1997),
- инхибиција клијања семена (*Corbineau & Rudnicki*, 1988; *Kumari & Sudhakar*, 2003),
- стимулација формирања пупољака (*Ravnikar* и сар., 1992),
- инхибиција издуживања коренова (*Wang* и сар., 2002),
- стимулација формирања и отварања цветних пупољака (*Zeng* и сар., 1999), и
- убрзавање развића цвета и плода (*Wilen* и сар., 199, *Czapski & Saniewski*, 199; *Zhang* и сар., 2006).

Јасмонска киселина и сродне компоненте су веома важни сигнални молекули који учествују у одбрани биљака од патогених организама и продукцији секундарних метаболита (*Farmer* и сар., 2003; *Gundlach* и сар., 1992). *JA* и метил-јасмонска киселина (*MeJA*) су елицитори тј. једињења која индукују како одбрамбене механизме, тако и продукцију разноврсних метаболита: изофлавоноида, хиперицина и хиперфорина, фенилпропаноида, сапонина и деривата кумарина (*Krzyzanowska* и сар., 2012), као и рузмаринске киселине у култури *in vitro* (*Georgiev* и сар., 2007; *Mizukami* и сар., 1993; *Ogata* и сар., 2004; *Szabo* и сар., 1999; *Tsuruga* и сар., 2006).

Иако јасмонати често инхибирају продукцију биомасе и стимулишу сенесценцију култура оптимизацијом концентрације и времена деловања може се избећи смањење масе и повећање акумулације секундарних метаболита (*Mulabagal & Tsay*, 2004).

1.2. Аклиматизација биљака

Коначни успех *in vitro* пропагације зависи управо од могућности да се биљке пренесу из стерилних у природне услове у великом броју и са високим степеном преживљавања (*Chandra* и сар., 2010). Кључни корак у овом процесу представља аклиматизација биљака, тј. адаптација биљака на изложеност абиотичком (другачији температурни услови, виши интензитет светлости, нижа влажност ваздуха) и биотичком стресу (микрофлора земљишног супстрата).

Специфични услови током којих биљке расту *in vitro*, као што су висока влажност ваздуха у суду за гајење, низак интензитет светлости и хетеро или миксотрофни начин исхране, чине често да се формирају биљке са смањеном фотосинтетском активношћу и са мањом количином епикутуларног воска. Хетеротрофни начин исхране и недовољно развијен механизам за контролу губитка воде чини ове биљке изузетно рањивим приликом прилагођавања условима који владају у стаклари или у пољу, а слабо развијен и често нефункционалан коренов систем, као и нефункционисање стома, додатно отежава посматрани процес.

Током аклиматизације потребно је да се биљке постепено навикавају на смањену влажност ваздуха, што се постиже повременим откривањем посуда за аклиматизацију. Продужавањем времена откривања долази до успостављања регулације транспирације. Висока влажност погодује развоју гљивичних инфекција и зато је неопходно да се биљке и земљиште третирају фунгицидом одговарајуће концентрације, који неће оштетити или својом токсичношћу усмртити биљке.

Важно је и да биљке на почетку буду на засенченом месту, како би се прилагодили широком спектру сунчеве светлости.

Након потпуне адаптације на услове стаклене баште биљке се преносе на отворено (*Chandra* и сар., 2010).

1.3. Секундарни метаболити

Метаболизам обухвата промет материје и енергије у организму. Дели се на примарни и секундарни метаболизам између којих не постоји јасна граница (*Böttcher* и сар., 2008). Примарни метаболизам обухвата процесе који имају улогу у основним животним функцијама (ћелијска деоба, раст, дисање, магационирање, репродукција) и повезан је са катаболизмом. Процесима секундарног метаболизма настају секундарни метаболити, једињења веома разноврсне хемијске природе, који употпуњују функционисање биљног организма (*Wink*, 2010).

Продукција секундарних метаболита подразумева присуство одговарајућих гена и неопходних ензима који су у највећем броју случајева специфични за врсту, род или фамилију. Сходно томе састав секундарних метаболита у појединим биљкама је сложен и зависи од ткива, органа, развојне фазе и фактора спољашње средине. Тако, на пример, органи важни за опстанак и репродукцију обично садрже највиши ниво секундарних метаболита. Ове разлике подлежу утицају животне средине као и генетској контроли (*Wink*, 1988)

Без обзира на њихову велику разноврсност разликујемо три велике групе секундарних метаболита: терпеноиде, алкалоиде и фенолна једињења (*Harborne*, 1999; *Bourgaud* и сар., 2001).

Основне функције секундарних метаболита су заштита биљке од напада вируса, бактерија, гљива, инсеката и хербивора (тзв. фитоалексини), регулација међусобних односа биљака (спречавање клијања семена или токсични - алелопатски ефекат). Поред тога, секундарни метаболити имају улогу у привлачењу опрашивача и дају укус, мирис и боју биљкама које се користе у исхрани (*Bourgaud* и сар., 2001).

Секундарни метаболити употпуњавају функционисање биљног организма у коме настају, омогућавају прилагођавање биљне врсте на различите еколошке факторе, а самим тим омогућавају опстанак дате врсте (*Hartmann*, 1996). Због ових карактеристика користе се у фармацеутској (лекови и помоћна средства), прехранбеној (адитиви за храну, ароме, мириси и прехранбене боје), као и у

козметичкој индустрији (козметички препарати и парфеми; *Ramawat & Mérillon*, 2008; *Verpoorte* и сар., 2000).

1.3.1. Улога елицитора у продукцији секундарних метаболита *in vitro*

Елицитори (*to elicit* (енг.) = изазвати, измамити) за биљне организме представљају једињења из различитих извора која могу бити покретачи физиолошког и морфолошког одговора, као и акумулације једињења која стимулишу било који тип одбране биљке (*Thakur & Sohal*, 2013). Овде спадају егзогени абиотички (као што су метални јони, неорганска једињења и др.) и биотички елицитори (гљиве, бактерије, вируси или хербивори), као и ендогени елицитори који обухватају компоненте ћелијског зида и метаболите које у одбрани од патогена или напада хербивора ослобађа сама биљка (*Namdeo*, 2007; *Nešković* и сар., 2010; *Zhao* и сар., 2005). Третман биљака елициторима или инфекција патогенима покреће спектар одбрамбених реакција, укључујући акумулацију биљних одбрамбених секундарних метаболита (*Zhao* и сар., 2005). Елицитори се понашају као сигнални молекули и учествују у активирању одбрамбених механизма код биљака. Биљке их разликују од токсина, који делују само у високим концентрацијама и утичу штетно, не активирајући биљни метаболизам (*Thakur & Sohal*, 2013). Коришћење елицитора биљних одбрамбених механизма представља једну од најефикаснијих стратегија за побољшање продукције биоактивних секундарних метаболита у култури *in vitro* (*Nair* и сар., 2013; *Roberts & Shuler*, 1997; *Szabo* и сар., 1999; *Yan* и сар., 2006). Осим тога, стимулацијом продукције секундарних метаболита елицитори редукују време потребно да се добије највиша концентрација продукта (*DiCosmo & Misawa*, 1995).

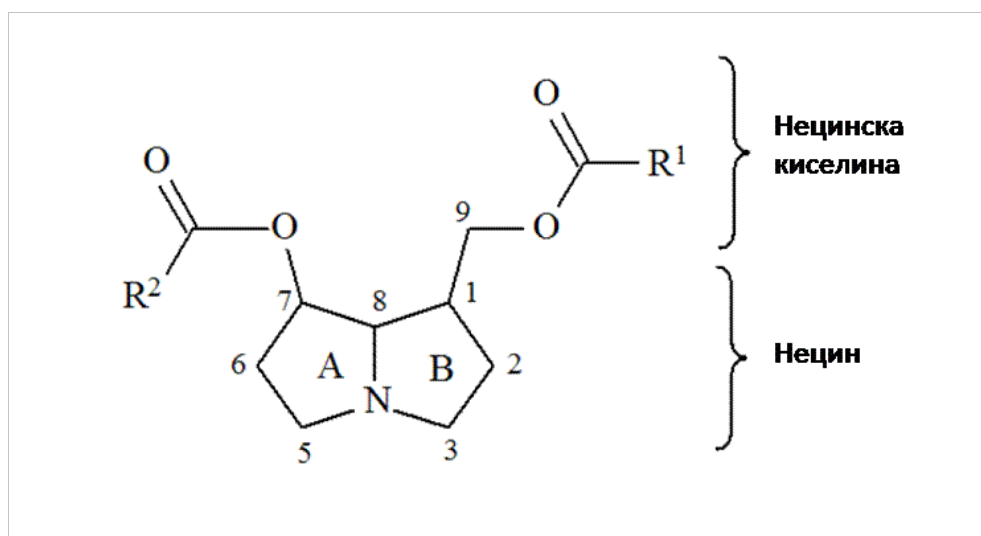
Пошто су култивациони услови који фаворизују брзи раст врло ретко исти са оним најбољим за биосинтезу секундарних метаболита, развијен је двостадијумски култивациони систем (*Collin*, 2001; *Kim*, 2002; *Kim* и сар., 2004; *Lin & Wu*, 2002; *Murthy* и сар., 2008). Ова стратегија подразумева развој оптималних услова за раст у циљу добијања максималне биомасе, да би се

у другом кораку индуковала синтеза секундарних метаболита, најчешће помоћу елицитора.

1.3.2. Пиролизидински алкалоиди

Пиролизидински алкалоиди (PA) су велика група секундарних метаболита који су присутни у 3% цветница. Најпознатије биљне врсте богате PA припадају фамилијама **Asteraceae** (*Tussilago farfara*, *Petasites sp.*, *Senecio sp.*, *Adenostyles alliariae*, *Eupatorium sp.*), **Boraginaceae** (*Symphytum sp.*, *Borago officinalis*, *Anchusa officinalis*, *Cynoglossum officinale*, *Echium sp.*, *Heliotropium sp.*, *Lithospermum sp.*) и **Fabaceae** (*Crotalaria sp.*) (Dreger и сар., 2009; Roeder, 1995).

Структурна основа PA је пиролизидински прстен, хексахидро пиролизин - нецин (Слика 5).



Слика 5 Основна јединица грађе пиролизидинских алкалоида

Овакав бициклични систем може да садржи једну или више хидроксилних група (аминоалкохол), и тада се назива нецин или нецинска база. Хидроксилне групе нецина су обично естерификоване нецинским киселинама. Комбинацијом нецина са нецинским киселинама теоријски се може добити велики број алкалоида. До сада је у природи пронађено око 350, а заједно са N-оксидима детектовано је око 600 једињења овог типа. Идентификовано је и

30-ак алкалоида отонецинског типа (*Simić, 2007*). Продукција *PA* у биљкама зависи од развојног стадијума и срединских услова (*Mandić и сар., 2013*).

PA могу имати неуротоксичне, мутагене, карциногене, али и антитуморске ефекте (*Dreger и сар., 2009; Liddell, 2000, 2001, 2002; Prakash и сар., 1999; Roeder, 2000; Roeder & Wiedenfeld, 2013*). Након уношења храном *PA* се апсорбују у танком цреву и преносе у јетру где испољавају свој токсични ефекат. *PA* могу да доведу до неповратних оштећења гена и хромозома, мењајући програм ћелијских деоба и доводећи до ћелијске смрти или до формирања канцерогених ћелија (*Dreger и сар., 2009*).

Досадашњим истраживањима је показано да су незасићени *PA* (ретронецин-, хелиотридин-, ортонецин- тип и моно и диестарски *PA*) токсични, док засићени облици *PA* (платифилин и розмаринин) не поседују тако изражен токсични ефекат (*Dreger и сар., 2009*).

1.3.3. Фенолна једињења

Фенолна једињења поседују ароматични прстен са једном или више хидроксилних група. Могу бити једноставни молекули, попут фенолних киселина, или сложена једињења, попут полифенола (*Robards и сар., 1999*). Фенолне киселине се јављају у биљкама у слободном облику или у форми естра или гликозида. Често се налазе у облику естара две или више истих или различитих фенолних киселина као што су: кафеинска, ферулинска, гална и сирингична. Најзаступљенији естри су изохлорогена, литоспермична и рузмаринска киселина. Фенолни гликозиди настају дејством глукозидаза (*Taki и сар., 1997*), а један од познатијих је изофлавоноски гликозид пронађен у соји (*Eldridge & Kwolek, 1983*)

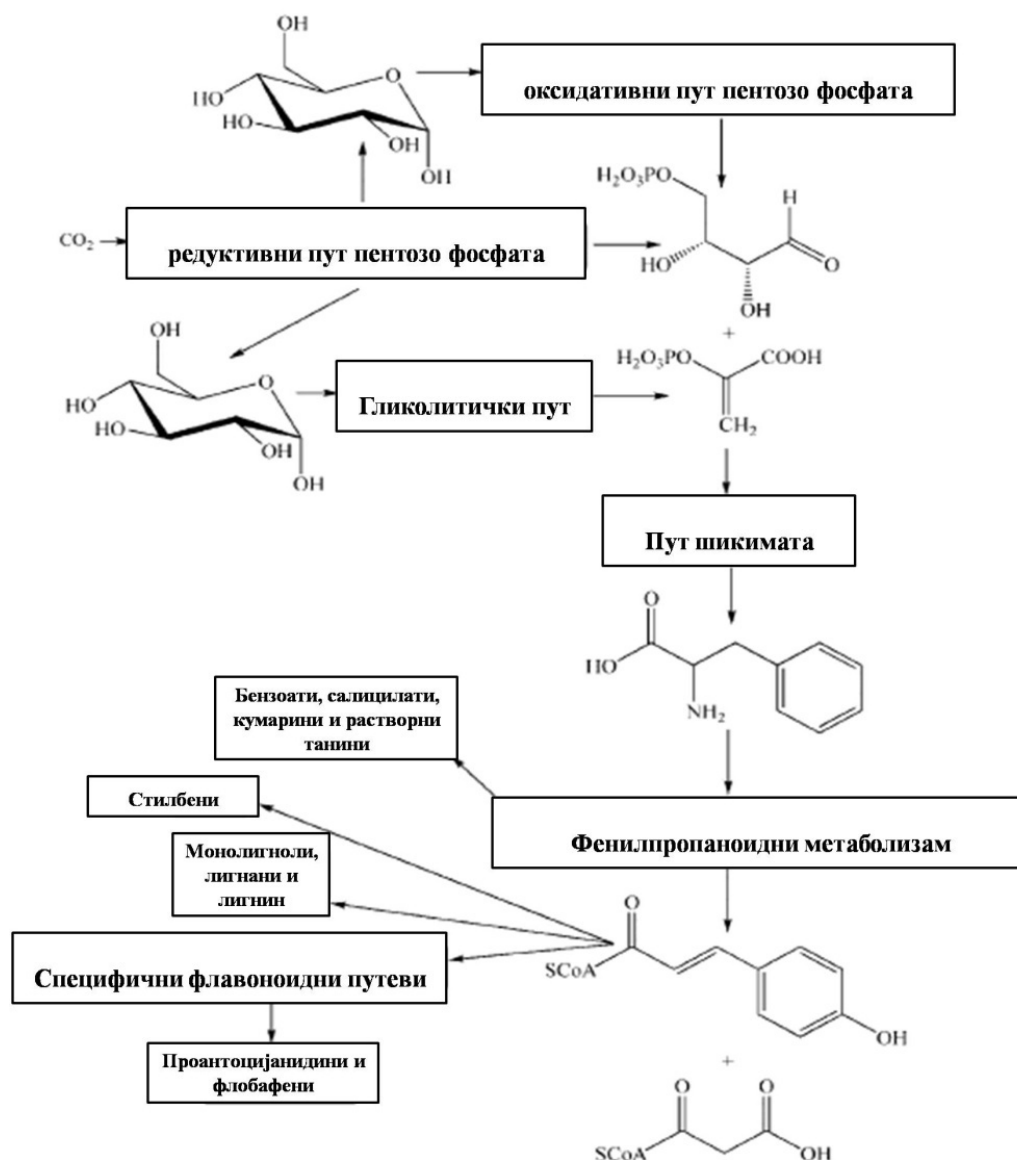
Подела фенолних једињења у групе које се међусобно разликују по броју конститутивних угљеникових атома коњугованих са основном структуром фенола је компликована и често различито представљена. Имајући у виду да фенолна једињења настају преко два метаболичка пута прихваћена је подела ових једињења на деривате шикиматског или фенилпропаноидног метаболизма (*Robards и сар., 1999*). Према броју конститутивних угљеникових атома у

основном скелету фенола постоје: прости феноли (фенилпропаноиди, кумарини и деривати бензојеве киселине; *Bowsher* и сар., 2008), фенолне киселине, нафтохинони, ксантони, стилбени, флавоноиди и лигнини (*Boros* и сар., 2010).

Према *Cheynier* и сар. (2013) метаболизам фенолних једињења у биљкама је сложен процес и обухвата неколико повезаних метаболичких путева:

- гликолитички пут у коме настаје фосфоенолпируват,
- пентозо-фосфатни пут у коме настаје еритрозо-4-фосфат,
- шикиматски пут у коме се синтетише фенилаланин,
- фенилпропаноидни метаболизам, чији су производи деривати циметне киселине и лигнин,
- различити специфични путеви синтезе флавоноида (**Слика 6**).

Фенолна једињења поседују антимулагено, антибактеријско и против упално дејство, а саставни део су лекова вазодилататора и лекова који се користе против тромбозе (*Middleton* и сар., 2000). Фенолна једињења нису активни антиоксиданси уколико немају супституисане хидроксилне групе у орто и пара положају, што повећава густину електрона у близини хидроксилних група, спушта енергију везе између кисеоника и водоника и повећава реактивност према липидним слободним радикалима. Супституција фенолних једињења у мета положају има ограничен ефекат. Антиоксидативна активност фенолних једињења изражена је захваљујући делокализованим електронима коњугованих двогубих веза (*Barclay* и сар., 1993; *Tomiyama* и сар., 1993). Према *Rice-Evans* и сар. (1996) полифеноли имају изражена антиоксидативна својства пошто могу сразмерно редукујућем потенцијалу лако да отпусте водоник или електрон. Судбина овако добијеног молекула зависи од његове способности да стабилизује и делокализује неспарени електрон. Као антиоксидативни агенси фенолна једињења поседују хемопревентивне ефекте у поремећајима индукованим оксидативним стресом (*Mandel & Youdim*, 2004; *Pan* и сар., 2013).



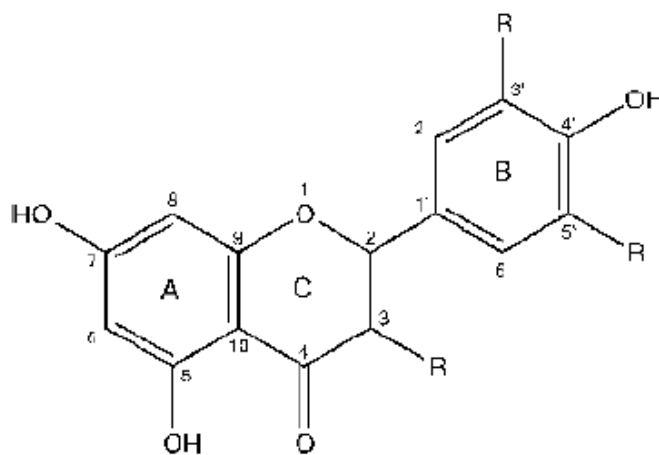
Слика 6 Метаболизам фенолних једињења (модификовано према *Cheynier* и сар., 2013).

1.3.3.1. Флавоноиди

Флавоноиди су присутни у свим васкуларним биљкама. Представљају највећу групу биљних полифенола и спадају у биљне пигменте који, поред каротеноида и беталаина, утичу на боју органа, нарочито цветова (*Davies* и сар., 2012). Имају велики број значајних функција у растењу и развићу биљака од којих су можда

најбитније привлачење опрашивача, повећавање отпорности биљака на абиотички стрес и одбрана од хербивора и патогена (Andersen & Markham, 2006). До сада је описано преко 10 000 структурних варијанти флавоноида (Williams и сар., 2004; Weston & Mathesius, 2013). Флавоноиди се у природи јављају као слободни (агликони) или у облику гликозида .

Основни структурни скелет флавоноида (Слика 7) чини 15 атома угљеника у основној структури (C6-C3-C6), од којих девет припада бензопиранском прстену (бензенски прстен A, кондензован са пиранским прстеном C). Осталих шест C - атома чине бензенски прстен (B) повезан са бензопиранским прстеном на позицији два (флаволи, дихидрофлаволи, флавоноли, катехини, флавани и антоцијанидини), три (изофлавоноиди) и четири (4-фенилкумарини). Систем који чине A и C прстен назива се бензо-1-пиран-4-хинон (Andersen & Markham, 2006).



Слика 7 Основна структура флавоноида (Yáñez и сар., 2012)

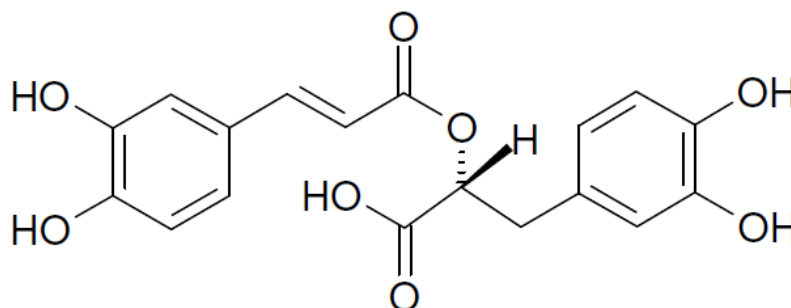
Флавоноиди се више од 70 година проучавају у *in vitro* и *in vivo* системима. У неким случајевима поседују јачу антиоксидативну активност од витамина Е. Ова група једињења повећава пермеабилност и еластичност капилара, спречава стварања крвних угрушака, снижава ниво масноће у крви и крвни притисак и смањује могућност добијања чира и појаве атеросклерозе. Флавоноиди

поседују антимикуробну, антивируалну, антиалергијску, антиинфламаторну, антихепатотоксичну, антинеопластичну и цитотоксичну активност (Cuyckens & Claeys, 2004; Yáñez и сар., 2012).

Ова група секундарних метаболита може бити и токсична уколико се конзумира у великим количинама. Познато је да може да индукује појаву анемије услед инхибиције апсорпције нутријента и минерала. Да би се искористиле повољности полифенола треба их конзумирати највише 10-70 (100) mg дневно (препоручене дневне дозе варирају у зависности од државе; Beecher, 2003; Scalbert & Williamson, 2000; Yáñez и сар., 2012).

1.3.3.2. Рузмаринска киселина

Рузмаринска киселина (RA) је естар кафеинске киселине (3,4-дихидроксициметне киселине) и 3,4-дихидроксифенилмлечне киселине (DHPL; Petersen & Simmonds, 2003 ; Слика 8). Scarpati и Oriente (1958) су је први изоловали и описали њену хемијску структуру (Слика 8), а име је добила по биљци рузмарину (*Rosmarinus officinalis*, фам. **Lamiaceae**) из које је изолована.



Слика 8 Структура рузмаринске киселине (Park и сар., 2008)

Рузмаринска киселина је широко распрострањена у биљном царству (Petersen, 2013). Детектована је у неким маховинама и папратима, као и у великом броју врста фамилија **Lamiaceae** (*Salvia miltiorrhiza*, *Melissa officinalis*, *Coleus*

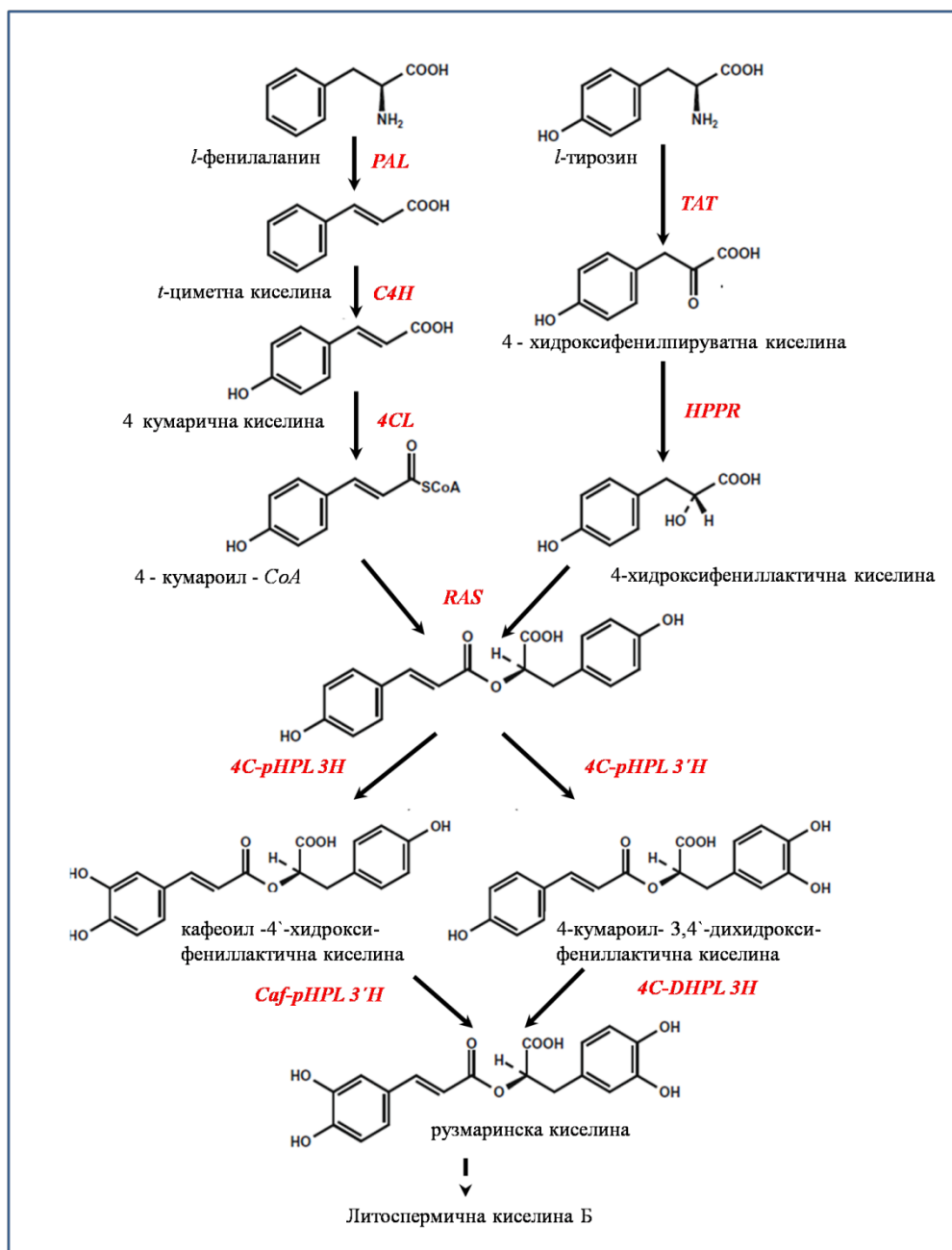
blumei, *Perilla frutescens*), **Boraginaceae** (*Arnebia euchroma*, *Lithospermum erythrorhizon*) и **Apiaceae** (подфамилија Saniculoideae) (Petersen, 2013; Le Claire и сар., 2005). Изданци, коренови, калуси и ћелијске суспензије, као и трансформисани коренови често производе *RA* у знатно већим количинама него биљке из природе. Чињеница да се у *in vitro* условима добијају знатне количине *RA* је искоришћена за њену комерцијалну производњу (Petersen, 2013).

RA показује разноврсна фармаколошка својства као што су превенција оксидације липопротеина мале густине и инхибиција пролиферативне активности муринских ћелија и циклооксигеназе (Bulgakov и сар., 2012). Осим тога, *RA* поседује антибактеријску, антивирану и антиоксидативну активност (Hraš и сар., 2000; Szabo и сар., 1999). Посебно је активна против реуматских и инфламаторних стања и представља супстанцу која се у фитотерапији користи за постопоравак (Pabsch и сар., 1991), а има и анти – *HIV* активност (Chen и сар., 1999). Захваљујући антисептичком, против упалном и антиинфламаторном дејству *RA* се често користи у фармацеутској, козметичкој и индустрији хране (Le Claire и сар., 2005; Park и сар., 2008; Petersen и сар., 2009).

1.3.3.2.1. Пут биосинтезе рузмаринске киселине

Резултати Landmann и сарадника (2011) указују на могућност да се *RA* синтетише алтернативним путевима у различитим биљкама. Биосинтеза рузмаринске киселине код биљке *Coleus blumei* (**Lamiaceae**) укључује осам ензима (Слика 9). Прекурсор су ароматичне аминокиселине *l*-фенилаланин и *l*-тирозин. Помоћу радиоактивног обележавања утврђено је да се код врста *Mentha arvensis* и *Mentha piperita* фенилаланин уграђује у кафеинску киселину, а тирозин у 3,4- дихидроксифенилмлечну киселину, које заједно граде рузмаринску киселину (Ellis & Towers, 1970; Shetty, 2007). Претпоставља се да је слични модел биосинтезе и код врста *Rosmarinus officinalis* (Scarpati & Oriente, 1958), *Coleus blumei*, *Salvia officinalis* (Petersen & Simmonds, 2003) и *Anchusa officinalis* (Petersen и сар., 1993). Према Petersen и сар. (1993) пут фенилпропаноида код *Coleus blumei* започиње конверзијом фенилаланина у 4 кумароил- *CoA* помоћу ензима фенилаланин амонијум лијазе (*PAL*), транс-цинамат 4 хидроксилазе (*C4H*) и

4-кумарат-*CoA* лигазе (*4CL*). У другој „грани“ ензим пиридоксалфосфат-зависна тирозин аминоксидотрансфераза (*TAT*) из *L*-тирозина формира 4- хидрокси-фенилпируват (*pHPP*), који се у даљем кораку редукује помоћу 4-хидроксифенилпируват редуктазе (*HPPR*) до 4-хидроксифениллактата уз коришћење *NADH* или *NADPH*. Специфична хидроксициметна трансфераза позната као синтаза рузмаринске киселине (*RAS*), врши трансфер 4-кумароил дела из 4- кумароил *Co-A* до алифатичне *OH*- групе 4 хидрокси фениллактата уз ослобађање *CoA* и образовање 4-кумароил-4`-хидроксифениллактата. Два слична ензима, 4-кумароил -4` хидроксифениллактат 3-хидроксилаза и 4-кумароил-4` хидроксифениллактат 3`-хидроксилаза, мењају 4-кумароил-4` хидроксифениллактат, а крајњи продукт, рузмаринска киселина, настаје дејством кафеил-4`-хидроксифениллактат 3`-хидроксилазе и 4-кумароил -3`,4`-дихидроксифениллактат 3- хидроксилазе (*Petersen* и сар., 2009). Новија истраживања показују да су у синтезу 4-кумароил-4`-хидроксифениллактата укључени цитохром *P450* зависна монооксигеназа (*CYP98A*) и *NADPH*:цитохром *P450* редуктаза (*CPR*), чија активност доводи до синтезе рузмаринске киселине (*Petersen*, 2013).

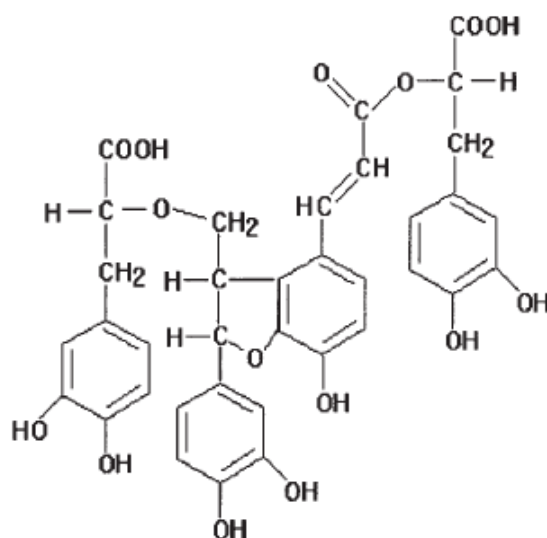


Слика 9 Пут биосинтезе рузмаринске киселине предложен за врсту *Coleus blumei*
 Скраћенице: **PAL** - фенилааланин амонијум лијаза; **C4H** – транс-цинамат–4-
 хидроксилаза; **4CL** - 4-кумарат-*CoA* лигаза; **TAT** - тирозин аминотрансфераза;
HPPR – 4 - хидроксифенилпируват редуктаза; **RAS** - “синтаза рузмаринске
 киселине” хидроксицинамоил-*CoA*: хидроксифениллактат
 - хидроксицинамоилтрансфераза; **4C - pHPL 3H**, **4C - pHPL 3'H** – 4-кумароил-4'
 хидроксифениллактат 3/3'-хидроксилаза; **Caf - pHPL 3'H** – кафеоил-4'-
 хидроксифениллактат 3'-хидроксилаза; **4C - DHPL 3H**- 4-кумароил-3',4'-
 дихидроксифениллактат 3 - хидроксилаза. Представљена схема је модификована
 према *Petersen* и сар. (2009) и према *Ma* и сар. (2013).

1.3.3.3. Литоспермична киселина Б

Литоспермична киселина Б (*LAB*; **Слика 10**) или салвианолична киселина Б, је димер рузмаринске киселине (*Tanaka* и сар., 1989; *Lu & Foo*, 1999).

Многе биљке садрже *LAB*, али мали број наведену киселину производи у високој концентрацији као нпр. врсте *Salvia officinalis*, *Lithospermum erythrorhizon* (*Yamamoto* и сар., 2002) и *Salvia miltiorrhiza* (*Chen* и сар., 2009; *Morimoto* и сар., 1994; *Yuan* и сар., 1998). Последњих година све је више података о успешној *in vitro* продукцији ове значајне супстанце (*Bulgakov* и сар., 2012; *Lu* и сар., 2011; *Ma* и сар., 2013).

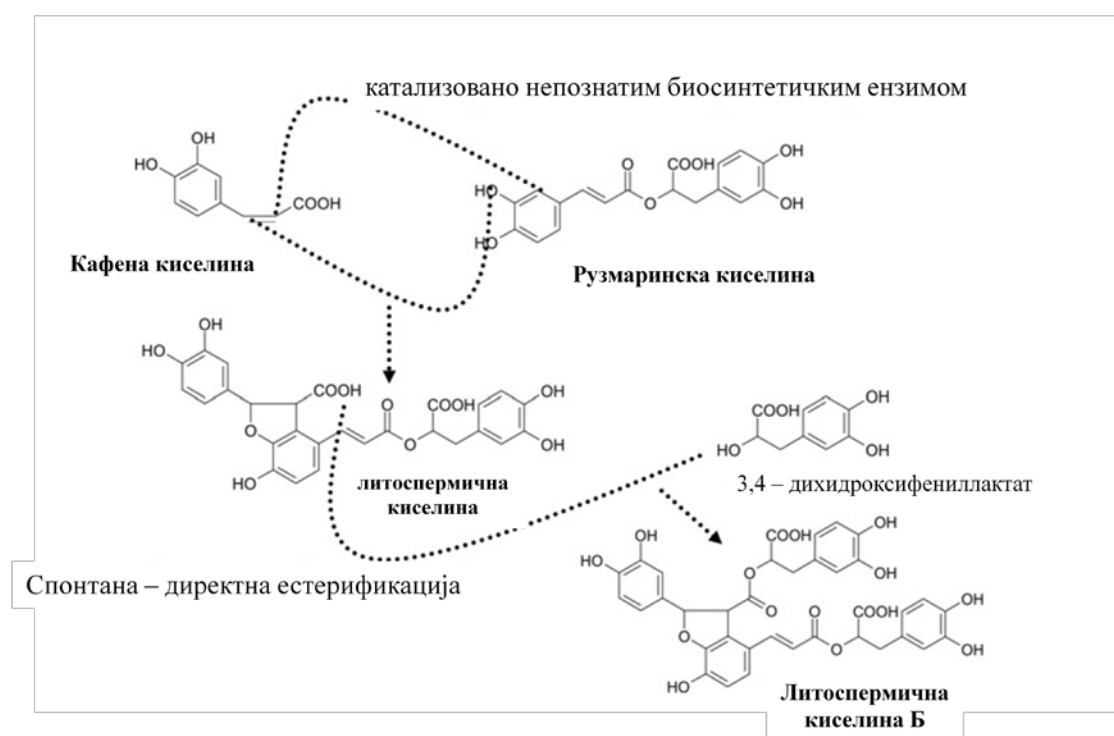


Слика 10 Структура литоспермичне киселине

LAB поред антиоксидативних својстава има врло значајна фармаколошка дејства јер утиче на олакшавање бубрежних болести, смањење крвног притиска, побољшање функционисања миокарда, инхибира алдозну редуктазу, а има и антихепатитична својства (видети *Yamamoto* и сар., 2002). Код дијабетичара редукује појаву појединих бубрежних дисфункција (*Li* и сар., 2001), а показује позитивне ефекате код пацијената са атеросклерозом (*Bulgakov* и сар., 2012).

1.3.3.3.1. Пут биосинтезе литоспермичне киселине

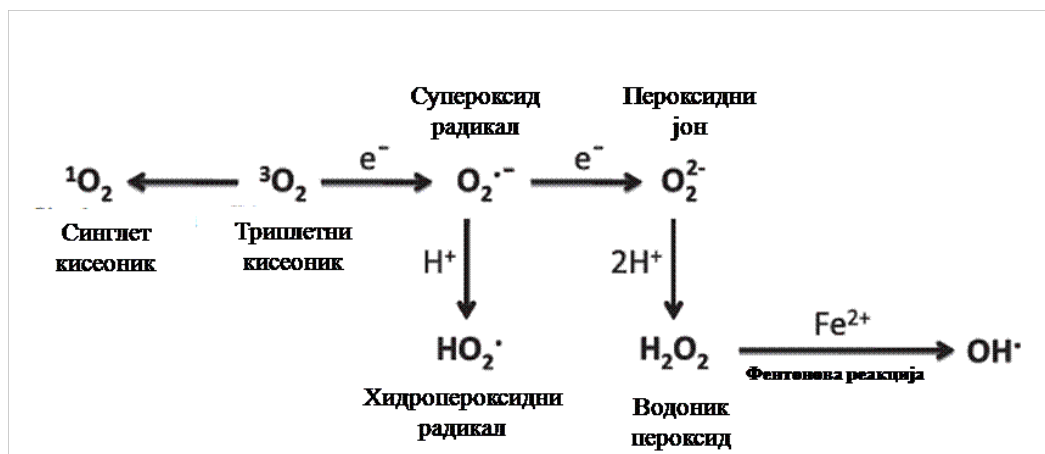
Сматра се да је биосинтетски пут *LAB* идентичан са биосинтетским путем *RA* (Слика 9). Након синтезе *RA*, за сада непознат ензим омогућава реакцију кафеинске киселине са *RA*, стварајући интермедијерно једињење (Слика 11). Ово једињење директном естерификацијом са 3,4 дихидроксифениллактатом даје *LAB* (Xiao и сар., 2010). Иако је до сада код врсте *Salvia miltiorrhiza* идентификовано 29 јединствених гена који кодирају 11 ензима укључених у биосинтезу фенолних киселина, није идентификован кључни ензим који доводи до синтезе *LAB* (Ma и сар., 2013);



Слика 11 Претпостављени пут биосинтезе литоспермичне киселине од розмаринске (модификовано према Xiao и сар., 2010).

1.4. Оксидативни стрес

Оксидативни стрес је процес током којег долази до повећане продукције и акумулације реактивних врста кисеоника (*ROS* – *eng.*, *reactive oxygen species*; **Табела 1**) које настају као продукти различитих метаболичких путева у присуству кисеоника (*Apel & Hirt, 2004*). *ROS* (**Слика 12**) могу постојати у облику слободних радикала као што су супероксид анјон радикал ($O_2^{\bullet-}$), хидроксил радикал (OH^{\bullet}), перхидроксил радикал (HO_2^{\bullet}), алкоксил радикал (RO^{\bullet}), и могу бити молекули као што су водоник пероксид (H_2O_2), синглет кисеоник (1O_2) и озон (O_3) (*Gill i Tuteja, 2010*). Нарушавање равнотежног стања количине *ROS* је биљној ћелији ефикасан показатељ нивоа стреса. Њихова количина и продукција треба да буде строго регулисани како претерана акумулација не би довела до оксидативног стреса, а затим и до ћелијске смрти (*Mittler, 2002*). *ROS* доводе до оштећења мембрана, пероксидације липида, оштећења нуклеинских киселина, агрегације и фрагментације протеина, као и до оксидације појединих аминокиселина, а оштећене протеине чине подложним протеолитичком нападу (*Halliwell, 2006*). Све је више доказа који указују да биљке активно производе *ROS* и регулишу њихову количину (*Apel & Hirt, 2004*). У многим случајевима је продукција *ROS* генетски програмирана, индукована стадијумом развића и променама у окружењу, са посебним ефектима на примарни и секундарни метаболизам. Оксидативни стрес изазива повећање производње *ROS*, што не мора увек да услови оштећење. Много је вероватније да повећана производња *ROS* утиче на активацију механизма који омогућавају биљкама да се што боље прилагоде срединским условима модификацијом генске експресије, метаболизма и физиологије (*Foyer & Noctor, 2005*). Биљке имају користи од регулисања производње *ROS* због њихове улоге у трансдукцији сигнала који контролишу различите процесе, као што су програмирана ћелијска смрт, одговор на абиотички и биотички стрес и одбрана од патогена (*Gill & Tuteja, 2010*).



Слика 12 Настанак ROS. Модификовано према Gill & Tuteja (2010).

Табела 1 Реактивне врсте кисеоника

Радикали	Нерадикали
$\text{O}_2^{\cdot-}$ супероксид анјон	H_2O_2 водоник пероксид
HO^{\cdot} хидроксил	HOCl хипохлорна киселина
RO_2^{\cdot} пероксил	O_3 озон
RO^{\cdot} алкоксил	${}^1\text{O}_2$ синглет кисеоник
HO_2^{\cdot} хидропероксид	${}^3\text{O}_2$ триплетни кисеоник

1.4.1. Антиоксидативни механизми заштите

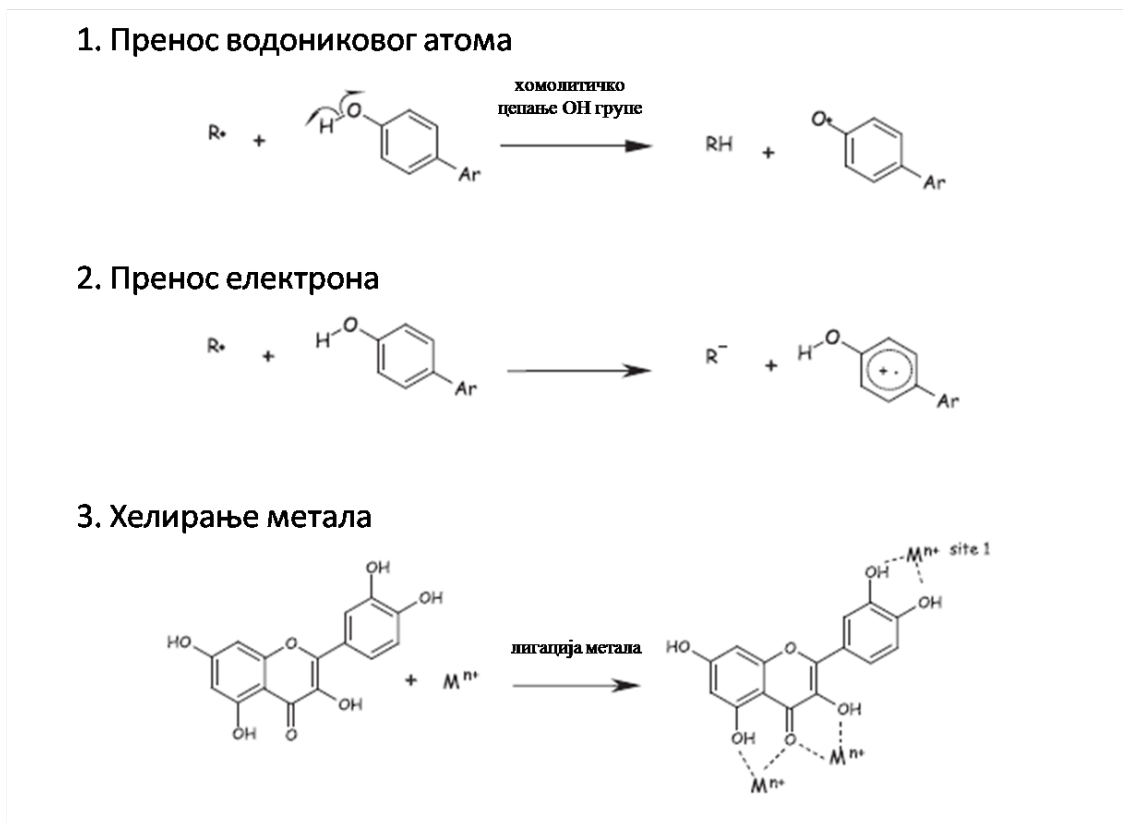
Због двоструке улоге коју ROS могу да имају у биљној ћелији, неопходна је прецизна регулација њиховог настанка и уклањања. Анатоомске адаптације биљака (различите заштите епидермиса и стома), физиолошке адаптације (C4 и CAM метаболизам) и молекуларни механизми којима се регулише фотосинтеза, могу да смање продукцију ROS током стреса (Gill & Tuteja, 2010). Механизми којима се активно уклањају ROS састоје се из ензимске и неензимске компоненте (Gill & Tuteja, 2010, Apel & Hirt, 2004). Ензими који контролишу ниво ROS у биљном ткиву су: супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), аскорбат пероксидаза (APX), глутатион редуктаза (GR) и глутатион пероксидаза (GPX). Неензимску компоненту контролног механизма чине антиоксиданси као што су:

аскорбат, глутатион (Mittler, 2002), α -токоферол, каротеноиди, пролин (Gill & Tuteja, 2010), алкалоиди, флавоноиди (Apel & Hirt, 2004), фенолне киселине, природни пигменти (нпр. капсаицин у паприци) и терпени (нпр. росманол, карносол, карносолна киселина, епиросманол, изоросманол и рузмаринска киселина; Zheng & Wang, 2001; Brewer, 2011).

Природни антиоксиданси штите биљке од зрачења и микробних инфекција. Уколико су присутни у храни могу да инхибирају или потпуно спрече настајање токсичних продуката и тиме продуже рок трајања намирница, одржавајући њихов нутритивни квалитет (Brewer, 2011).

1.4.2. Антиоксидативна активност фенолних једињења

Фармаколошка активност фенолних антиоксиданаса приписује се њиховој способности да „сакупљају” слободне радикале и да хелирају метале (Soobrattee, 2005). У раду Leopoldini и сар. (2011) издвојена су три начина на која се овај процес може одвијати (Слика 13). Први начин уклањања слободног радикала (R^\bullet) из система заснива се на хомолитичком цепању OH групе и преносу водениковог атома са фенолног једињења ($Ar-OH$) на слободни радикал. Настали фенол радикал (ArO^\bullet) је мање реактиван јер може да стабилизује и делокализује неспарени електрон (Слика 13.1.). Други механизам базиран је на преносу једног електрона са фенолног једињења. Овако настаје анјон са спареним бројем електрона (R) и катјонски радикал ($ArOH^+$) чија је ароматична структура стабилизована делокализацијом електрона у више резонантних облика (Слика 13.2.). Трећи механизам заснива се на способности фенолних једињења да за себе везују метале, формирајући стабилне комплексе и спречавајући метал да реагује са супстратима (протеини, липиди, угљени хидрати и ДНК) који производе слободне радикале (Palmer & Paulson, 1997; Слика 13.3.). Приликом Фентонове реакције H_2O_2 може да реагује са металима у нижем оксидационом стању и да формира врло реактиван и цитотоксичан хидроксил радикал ($\bullet OH$) који је један од најштетнијих радикала у биљном ткиву (Schulz, 2000).



Слика 13 Механизми антиоксидативне активности: 1. Пренос водониковог атома; 2. Пренос електрона и 3. Хелирање метала (модификовано према *Leopoldini* и сар., 2011)

1.5. *Rindera umbellata* (Waldst. & Kit.) Bunge – класификација, ботаничке карактеристике и распрострањеност

Класификација:

Царство	Plantae
Раздео	Magnoliophyta
Класа	Magnoliopsida
Подкласа	Asteridae
Ред	Lamiales
Фамилија	Boraginaceae
Подфамилија	Boraginoideae
Род	<i>Rindera</i> Pall.
Врста	<i>Rindera umbellata</i> (Waldst. & Kit.) Bunge

Биљна врста *Rindera umbellata* (Waldst. & Kit.) Bunge. - шерпет припада фамилији **Boraginaceae** која обухвата 146 родова (<http://www.diversityoflife.org/taxpage/0/family/Boraginaceae.html>) од којих је у Србији заступљено 17 родова (*Josifović* и сар., 1974) са 65 врста (*Stevanović* и сар., 2006).

Род је добио име у част лекара и ботаничара Андреаса Риндера (<http://linnean-online.org/view/correspondence/Rinder=3AAndreas=3A=3A/Linnaeus=3ACarl=3A=3A.html>). Према најновијим подацима род има 50 представника (<http://www.plantsystematics.org/taxpage/0/genus/Rindera.html>). *Rindera umbellata* је двогодишња до вишегодишња биљка. Осовински, незадебљао корен је тамне боје. Биљка је монокарпна, има просто, ребрasto стабло прекривено паучинастим длакама. Стабло може да достигне висину и 60 *cm*, на врху је гранато и густо обрасло листовима. Базални листови су растресито паучинасто длакави, ланцетасти или дугуљасти, дуги 10-15 *cm*, а широки 2 *cm* и образују розету. При основи су сужени и постепено прелазе у лисне дршке. Врх листова је ушилјен. Листови стабла су ланцетасти, горњи су линеарни седећи и краћи идући ка врху стабла. Многобројни цветни увојци на врху стабла граде сложену штитасту цваст (*umbellátus* (лат.) = штитаст, има цваст у облику штита), без брактеја (**Слике 14 А, Б, В Г**). Цветови су савијени наниже и налазе се на јако длакавим дршкама. Чашница је бела од вунастих длака, 10 *mm* дуга, са правостојећим окрајцима (**Слика 12 Д**). Петоделна круница може бити од златно жуте до бакарне боје, цилиндрична је и дуга око 15 *mm*, са продуженим, тупим, правостојећим, 5 *mm* дугим режњевима (**Слика 14 Ђ**). Стубић је кончаст, далеко истурен изнад крунице. Жиг је врло мали, главичаст и цео. Антере су издужено линеарне, 6 *mm* дуге и округле при основи. Налазе се на 5 *mm* дугим филаментима, па врло мало надвисују режњеве крунице. Орашице су крилате, глатке, сјајне, окриљене и имају 14-15 *mm* у пречнику (**Слике 14 Е, Ж**). Са леђне стране су пљоснате, са ниским боковима (*Josifović* и сар., 1974).



Слика 14 *Rindera umbellata* у природи. А) млада цваст, Б) незрели цветови у цвасти, В) зрели цветови и формиране зелене орашице, Г, Е) зреле орашице, Д) длакава чашаца петоделна круница и жиг, Ђ) петоделна круница, тучак и прашници, Ж) семе

Природна станишта шерпета су малобројна и ограничена на песковите локалитете Бугарске, Румуније и Молдавије. У Србији *R. umbellata* расте у оквиру биљне заједнице *Chrysopogonietum pannonicum* L. Stjer.-Ves. (Stevanović, 1977 [1988]) Делиблатске пешчаре (Слика 15 А - В), и у Кладовској (Рамској) пешчари (близу Кладова, Радујевца, на Горици и Царевом Пољу; Josifović и сар., 1974). Делиблатска пешчара представља “*locus classicus*“ ове биљне врсте, где су је под именом *Cynoglossum umbellatum* описали Waldstein и Kitaibeli. Под синонимом *Mattia umbellata* (Waldst. & Kit.) Schult се такође може наћи у литератури (Bunke & Merkl, 1996; Gardens, 1908). Представља степски реликт. У време цветања прави је украс пешчаре, а због свог атрактивног изгледа представља мету љубитеља цвећа. Услед штетног антропошког дејства (култивација природних станишта и неконтролисаног сакупљања), отежаног размножавања у природним условима (услед инфекције гљивама, Ljajević-Grbić и сар., 2005) и мале вијабилности семена, ареал њеног распрострањења је ограничен. Зато је уврштена у Црвену књигу флоре Србије као ретка и угрожена биљна врста (Diklić и сар., 1999). У Републици Србији налази се на списку строго заштићених биљних врста ("Службени гласник РС", број 5/10).



Слика 15 *Rindera umbellata* у природном окружењу Делиблатске пешчаре, мај 2010 А) зрели цветови, Б) незрели цветови и В) биљна заједница (аутор Данијела Миљковић)

2 Циљ рада

Основни циљ овог истраживања био је испитивање физиолошких и фитохемијских особина биљака врсте *Rindera umbellata* (Waldst. & Kit.) Bunge гајених *in vitro*.

Реализација овог циља извршена је кроз неколико задатака:

- Увођење у културу *in vitro* врсте *R. umbellata* и успостављање оптималних услова за растење и умножавање изданака у циљу *ex situ* заштите.
- Испитивање ефеката угљених хидрата и регулатора растења у морфогенези и растењу биљака.
- Испитивање ефеката угљених хидрата и регулатора растења на продукцију фенолних једињења у биљкама *R. umbellata* гајених *in vitro*.
- Испитивање ефеката угљених хидрата и регулатора растења на промене у антиоксидативним својствима биљака *R. umbellata* гајених у условима *in vitro*.
- Упоредна анализа фитохемијских карактеристика и антиоксидативних својстава биљног материјала *R. umbellata* добијеног у *in vitro* условима и оног који је сакупљен на природном станишту.
- Дизајн прајмера и оптимизација протокола за анализу гена из биосинтетичког пута рузмаринске киселине

3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Биљни материјал

За успостављање *in vitro* културе као примарни експлантати коришћени су незрели ембриони изоловани из цвасти биљака сакупљених у Делиблатској пешчари у јуну 2006. године. Сви експерименти *in vitro* рађени су на клоновима биљака пореклом од ових незрелих ембриона.

За потребе анализе садржаја секундарних метаболита биљака из природе коришћен је биљни материјал сакупљен током маја 2011. године у Делиблатској пешчари (Дозвола за сакупљање строго заштићених и заштићених биљних врста биљака у научноистраживачке сврхе бр. 353-01-184/2011-03 од 5.5.2011. године; Прилог 4).

3.2. Састав хранљивих подлога

У експериментима *in vitro* коришћена је чврста хранљива подлога која се састојала од основних макро- и микро- соли и витамина по *Murashige* и *Skoog* (1962) и 0,7% агара (Торлак, Београд, Србија) означена као МС (Табеле 2 и 3). Пре аутоклавирања *pH* вредност подлоге подешавана је на 5,8.

За успостављање *in vitro* културе из незрелих ембриона коришћена је МС хранљива подлога са сахарозом као извором угљеника у концентрацији од 30 g l^{-1} (0.088 М).

МС подлога са 30 g l^{-1} сахарозе је уз додатак $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ бензил-6-аминопурина (*BAP*; *Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA*) и $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ индол-3-сирћетне киселине (*IAA*; *Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA*) служила за регенерацију и мултипликацију адвентивних пупољака.

Утицај различитих угљених хидрата на биљке испитиван је на МС подлози у коју су додавани глукоза (*Zorka Pharma*, Шабац, Србија), фруктоза (*Merck-Alkaloid*, Скопље, Македонија) или сахароза (комерцијално паковање) у концентрацијама од 0,003 до 1 М. У даљим експериментима коришћен је угљени хидрат који је у овом експерименту одређен као оптималан за раст.

МС подлога уз додатак 0,1 М сахарозе коришћена је за испитивање утицаја регулатора растења. Коришћене су 1 μM и 10 μM гиберелна киселина (GA_3 ; *Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA*), односно 25, 50, 100 и 200 μM јасмонска киселина (JA ; *Duchefa Biochemie, Haarlem, Холандија*). Обе киселине додаване су методом филтер-стерилизације (филтери: *MF-Millipore Membrane Filter*, величина пора 0,22 μm , ϕ 25 mm, *EMD Millipore Corporation, Billerica, USA*) у претходно стерилисану подлогу.

Табела 2 Састав раствора минералних соли (*Murashige i Skoog, 1962*)

Макроелементи	mg l^{-1}	mM
KNO_3	1.900,000	18,793
NH_4NO_3	1.650,000	20,612
KH_2PO_4	170,000	1,249
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440,000	2,993
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370,000	1,501
Микроелементи	mg l^{-1}	μM
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22,300	100,000
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,600	29,907
H_3BO_3	6,200	100,259
KJ	0,830	4,999
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,100
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,250	1,033
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,105
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,200	99,933
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,800	99,989

Табела 3 Састав раствора витамина (*Murashige i Skoog, 1962*)

Витамини	mg l^{-1}	μM
тиамин-хлорид (B1)	0,100	0,296
пиридоксин-хлорид (B6)	0,500	1,348
Никотинска киселина (B3)	0,500	4,061
глицин	2,000	26,642
мио-инозитол	100,000	555,062

3.3. Површинска стерилизација биљног материјала

Незрела семена су прво испирана у текућој чесменској води током 30 мин., потом су површински стерилисана у 50% комерцијалном избелјивачу у трајању од 5 до 10 минута, а затим пет пута испирана стерилном дестилованом водом. Стерилно су им одстрањена крилца и омотач да би се ослободили незрели ембриони. Овако третирани ембриони расли су у петри кутијама на МС подлози у присуству 30 g l^{-1} сахарозе. Након 10 дана су пребачени у ерленмајере на подлогу истог састава.

3.4. Услови гајења култура и експериментални дизајн

Културе *in vitro* су гајене у климатизованој соби на температури од $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, при светлосном режиму дугог дана (16 сати светла и 8 сати мрака). Релативна влажност ваздуха у посудама износила је 60 – 70%. Густина фотонског флукса од $32,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ на нивоу узорака остварена је помоћу белих флуоросцентних цеви (Тесла, Панчево, Србија).

У свим експериметима као почетни експлантати коришћени су изоловани апикални делови стабла дуги 10 mm пореклом од адвентивних пупољака. У експериметима је праћен ефекат угљених хидрата и регулатора растења на морфогенезу и растење адвентивних изданака, садржај секундарних метаболита и антиоксидативну активност биљака врсте *R. umbellata*. Осим тога, идентификовани су поједини гени укључени у синтезу рузмариנסке киселине.

Експеримент у којем је праћен ефекат угљених хидрата на раст *in vitro* култура трајао је 4 недеље, док је ефекат различитих концентрација GA_3 (1 и $10 \mu\text{M}$) на посматране процесе праћен у два одвојена експеримента у трајању од 4, односно 6 недеља. Експеримент у коме је испитиван утицај *JA* подељен је у три фазе. Припремна фаза трајала је 21 дан и обухватала је гајење биљака у условима дугог дана на МС подлози у присуству $0,1 \text{ M}$ сахарозе. У следећој фази биљке са формираном розетом и са одстрањеним кореновима (како би се уједначио узорак) пребачене су на исту МС подлогу којој је додата *JA* у различитим концентрацијама ($25 - 200 \mu\text{M}$). Пошто је за растварање *JA* коришћен 96% етанол,

подешено је да финална концентрација етанола у свим подлогама износи 0,09% (v/v). Биљке су током друге фазе експеримента гајене на овим подлогама током 1, 2 и 14 дана. Након ове фазе део материјала је одмах анализиран, а део биљака је коришћен за трећу фазу експеримента. Трећа фаза обухватала је опоравак биљака у трајању од 14 дана на МС подлози са 0,1 М сахарозом у одсуству ЈА. Контролна група експлантата паралелно је гајена у истим условима на МС подлози са сахарозом концентрације 0,1 М, без ЈА, и у свакој новој фази експеримента преношена на свежу подлогу. Мерења су вршена након друге и треће фазе. Овај биљни материјал је касније коришћен и за анализу садржаја секундарних метаболита и антиоксидативну активност.

3.5. Аклиматизација биљака на услове стакларе и поља

Добро ожиљене биљке преношене су у саксије у мешавину глистењака и кварцног песка (7:3). Земља и биљке су третиране фунгицидом (0,3% *Previcur 607-SL*, Bayer CropScience, Monheim, Немачка) три пута (при пресађивању у земљу, након 14 дана и након 2 месеца). Аклиматизација биљака је постигнута повременим уклањањем стакла којим су прекриване саксије у све дужим временским периодима до потпуног уклањања након две недеље. Биљке су гајене у условима дугог дана на температури од 25 ± 5 °C и при релативној влажности ваздуха од $80 \pm 10\%$. После успешне аклиматизације у стаклари биљке су пренете у поље. Успешност аклиматизације у стаклари изражена је у процентима преживљавања након два месеца од преношења биљака у земљу. Процент преживљавања на огледном пољу утврђен је после годину дана. Процент процветалих биљака анализиран је након прве и друге године раста на огледном пољу.

3.6. Екстракција пиролизидинских алкалоида

Осушен и самлевен биљни материјал сваког узорка екстрахован је помоћу метанола (CH_3OH). Након уклањања растварача суви остатак је растворен у 1 М сумпорној киселини (H_2SO_4). Смеша је екстрахована помоћу дихлор-метана (CH_2Cl_2). Помоћу NH_4OH pH вредност раствора подешена је на 9,0.

Пречишћавање дихлор-метанског екстракта вршено је хроматографијом на силика-гел колони и помоћу танкослојне хроматографије у циљу добијања чистих алкалоида. Коришћени растварач је била смеша $CH_2Cl_2 : CH_3OH : NH_4OH$ (9:1:0,1), а поларност је повећавана додавањем метанола. За визуализацију је коришћен *Dragendorff*-ов реагенс или је хроматограм прскан 50% H_2SO_4 .

3.7. GC-MS анализа пиролизидинских алкалоида

За GC-MS анализу (гасна хроматографија са масеном спектрометријом) коришћен је *Agilent 7890A GC* систем опремљен *5975C* инертним *XL EI/CI MSD* и *FID* детекторима повезаних помоћу капиларног протока кроз двосмерни сплитер (разделник) са носећим гасом. Коришћена је *HP-5 MS* капиларна колона (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*, промера 25 μm промер, дужине 30 m и дебљине филма 0.25 μm). Узорци су инјектирани у раздвојеном режиму при температури од 250 $^{\circ}C$. Проток носећег гаса хелијума (*He*) износио је 1,1 $ml\ min^{-1}$, док је температура колоне линеарно програмирана у опсегу 100-325 $^{\circ}C$ са порастом од 110 $^{\circ}C$ у минути. Преносна температурна линија била је 320 $^{\circ}C$. Температура пламено јонизујућег детектора (*FID*) одржавана је на 300 $^{\circ}C$. Електронски масени спектри (*EI*) снимани су у режиму од 70 eV , при чему је одржаван однос m/z у опсегу 45-450. Температура трансфер линије износила је 230 $^{\circ}C$. Резултати су приказани квалитативно.

Метилен хлоридни раствор смеше пиролизидинских алкалоида (*PA*) узорака биљног материјала сакупљеног из природе упарен је до 1 ml и инјектирано је по 1 μl у колону. Узорци изданака и коренова гајених *in vitro* упарени су до 0.2 ml , а инјектирана је по 3 μl .

3.8. Екстракција фенолних једињења

Биљни материјал је сушен на собној температури 7 дана, затим су одвајани зелени делови и одмеравани за екстракцију. Након хомогенизације течним азотом материјал је преношен у микро тубе и преливан метанолом у односу 1:10 w/v (*Applichem GmbH*, Немачка, квалитет *Pro Analisi*). По завршетку екстракције у трајању од 15 минута, материјал је центрифугиран 20 минута на

15000 g и 4 °C. Супернатант је одливан у нови суд. Након филтрације (*Econofilter*, величина пора 0,45 μm , *Agilent Technologies*, Немачка) екстракти су до употребе чувани на температури од -20 °C.

3.9. Спектрофотометријско одређивање количине укупних слободних фенола

Количина укупних слободних фенола одређивана је спектрофотометријски коришћењем методе по Фолин-Чикаљтеу (*Folin-Ciocalteu; Feldman & Hanks*, 1968). Метода се заснива на колориметријској реакцији Фолин-Чикаљтеовог (FC; *Merck, Darmstadt*, Немачка) реагенса са одговарајућим редукујућим реагенсом.

Количина од 50 μl екстракта (слепа проба уместо узорка садржи метанол) помешана је са 475 μl 5% раствора натријум-карбоната (Na_2CO_3 - *Merck-Alkaloid*, Скопље, Македонија) и након 5 минута овој смеси је додато 475 μl свеже разблаженог (1:1) FC реагенса. Смеша је инкубирана један сат у мраку, на собној температури. Након инкубације очитана је апсорбанца добијене смеше на 724 nm (*HP Agilent 8453 Spektrofotometar, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA*). Под истим условима су измерене апсорбанце различитих познатих концентрација рузмаринске киселине (од 0,2 до 2,4 mM; *LGC Standards*, Лондон, Велика Британија). На бази измерених вредности апсорбанце на 724 nm, помоћу одговарајуће једначине калибрационе криве израчунат је садржај укупних слободних фенола. Пошто је у испитиваним узорцима најзаступљеније фенолно једињење била рузмаринска киселина, резултати су изражени у милиграм-еквивалентима рузмаринске киселине (RA) по граму суве масе узорка (mg ERA g^{-1} DW).

3.10. Квантитативна и квалитативна HPLC-DAD анализа садржаја фенолних једињења у метанолним екстрактима *R. umbellata*

Методом течне хроматографије под високим притиском (HPLC) идентификована су и квантификована фенолна једињења у екстрактима шерпета. Коришћен је апарат *Hewlett Packard HPLC* модел 1100 са *Diode Array (DAD)*

детектором. За раздвајање фенолних једињења употребљена је колона *Hypersil BDS-C18* са дијаметром честица $5 \mu\text{m}$, унутрашњег пречника $125 \times 2 \text{ mm}$. Мобилна фаза је представљала смешу 0,1% воденог раствора фосфорне киселине (H_3PO_4 ; *Lachner, Neratovice*, Република Чешка) – раствор А и ацетонитрила (CH_3CN ; *HPLC* чистоће, *Acros Organics, Geel*, Белгија) – раствор Б. Узорци су елуирани при константној температури од $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Проток мобилне фазе је био $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, а линеарни градијент раствора А и Б је мењан у току времена на следећи начин: у првих 20 минута однос раствора А и Б био је 92,5% : 7,5%. Након тога је повећаван удео раствора Б у следећих 5 минута на 20%, са даљим повећањем удела на 25% током наредних 5 минута. Последњих 5 минута елуирања однос раствора био је као на почетку (92,5 : 7,5) што омогућава еквилибрацију. Параметри методе приказани су на **Слици 16**.

Хроматографски услови:

Хроматографска колона: *Hypersil BDS-C18* ($5 \mu\text{m}$, $125 \times 2 \text{ mm I.D}$)

Мобилна фаза: А – 0,1% водени раствор фосфорне киселине (H_3PO_4)
Б - ацетонитрил (CH_3CN)

Проток: $0,5 \text{ ml min}^{-1}$

Елуирање: линеарни градијент приказан у табели

Време (<i>min</i>)	%А (H_3PO_4)	%Б (CH_3CN)
0	92,5	7,5
20	80,0	20,0
25	75,0	25,0
30	92,5	7,5

Детекција: *Diode Array* (210, 266, 310 и 326 nm)

Температура колоне : $+ 30 \text{ }^\circ\text{C}$

Време трајања анализе : 30 min .

Слика 16 Основни параметри за *HPLC-DAD* одређивање количине фенолних једињења у метанолном екстракту узорака *Rindera umbellata*.

За идентификацију фенолних једињења у узорцима стандардне криве су добијене на основу пет различитих концентрација стандардне смеше (катехин, кониферил алкохол, гална, хлорогена, кафеинска, *p*-кумаринска, ферулинска и рузмаринска киселина; *Sigma-Aldrich, Oakville, ON*, Канада). Оне су омогућиле идентификацију фенолних компоненти поређењем времена задржавања (R_t – ретенционо време) и спектралних карактеристика на различитим таласним дужинама (210, 266, 310 и 326 nm) и квантификацију идентификованих једињења поређењем површина испод пика узорка и стандарда. Добијени хроматограми анализирани су у програму *HP Chemstation chromatographic software (Palo Alto, CA, USA)*.

3.11. Квалитативна и квантитативна UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS анализа (Течна хроматографија под ултра високим притиском са UV детекцијом и MS/MS масеном спектрофотометријом) садржаја фенолних једињења у метанолним екстрактима биљака из природе и *in vitro*

Хроматографско раздвајање метанолних екстраката је урађено на *Dionex Ultimate 3000 UHPLC* систему (*Thermo Fisher Scientific, Bremen*, Немачка) у чијем се склопу налази бинарна пумпа, вакуум дегасер, термостат за колоне, ауто-семплер и UV/VIS детектор (*DAD*, енг. *diode array detector*). UHPLC систем је конфигуриран са *triple-quadrupole* масеним спектрофотометром (*TSQ Quantum Access MAX, Thermo Fisher Scientific, Bremen*, Немачка) са електрон спреј јонизацијом (*HESI*, енг. *Heated electro spray ionization*). Хроматографско раздвајање је урађено на *Hypersil gold C18* колони димензија 50 x 2,1 mm, са честицама величине 1,9 μm (*Thermo Fisher Scientific, USA*).

Мобилна фаза се састојала од 0,1% раствора мравље киселине (А) и ацетонитрила (Б), а узорци су елуирани према следећем градијенту: 5-20% Б у прва 3 минута; 20–40% Б од 3 до 5 минута, 40-50% Б од 5 до 7,5 минута, 50–60% Б у периоду од 7,5-8,5 минута, 60–95% Б од 8,5 до 10,5 минута, 95% Б до 11,5 минута, 95% до 5% Б од 11,5 до 12 минута, и на крају 5% Б до 15 минута. Проток је подешен на 0,4 ml min⁻¹ а таласне дужине на 225, 260 и 320 nm.

Све анализе су урађене коришћењем раствора *MS* квалитета (*Fisher Scientific, Leics*, Велика Британија). Колона је термостатирана на 30 °C, док је инјекциона запремина била 2 μl . За контролу *UHPLC* инструмента коришћен је *Chromeleon Xpress* софтвер (*Thermo Fisher Scientific, Bremen*, Немачка).

Температура јонске пробе (енг. *vaporizer temperature*) масеног спектрофотометра подешена је на 350 °C. *HESI* проба је подешена на следеће параметре: волтажа 4000 V, притисак носећег гаса (N_2) 50 AU (арбитрарне јединице; енг. *Arbitrary units*), притисак гаса у јонском извору 0 AU, притисак ауксиларног гаса 20 AU, температура капиларе 270 °C, подешавање јонских сочива 0 V. Подаци добијени на масеном спектрофотометру су праћени у позитивном и негативном модалитету у опсегу *m/z* од 100 до 1000.

У експериментима фрагментације, дисоцијација молекула је индукована колизијом (*CID*, енг. *collision-induced dissociation*), при чему је енергија колизионе ћелије подешена на 30 eV. У *PIS* (енг. *product ion scanning*) експериментима, *MS/MS* продукт јони су добијени дисоцијацијом одабраних јона прекурсора у колизионој ћелији *triple-quadrupole* масеног спектрофотометра (*Q2*), а њихове масе су анализиране у *Q3* квадруполу инструмента. У *NLS* (енг. *neutral loss scanning*) експериментима *Q1* и *Q3* квадрупולי заједно скенирају парове јона који се разликују у карактеристичним неутралним масама - масама које се не јонизују и услед тога их није могуће детектовати квадруполима. *SRM* (енг. *selected reaction monitoring*) је најосетљивији тип анализе коришћеног инструмента који показује највећу специфичност за анализирано једињење, и због тога се најчешће користи за апсолутну квантификацију.

За квалитативну анализу фенолних једињења коришћени су различити типови (модалитети) скенирања, укључујући *FS* (енг. *full scan*), *PIS*, *SRM* и *NLS*. Рузмаринска киселина (*RA*) је идентификована на основу *UV*, *MS* и *MS/MS* спектра, као и коришћењем одговарајућег раствора стандарда (*Sigma Aldrich*, Немачка), припремљених у метанолу, у односу 1:1 (*w/v*). Сток стандарда разблажен је до концентрације 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Калибрациони нивои су добијени инјектирањем различитих запремина раствора стандарда. Квантификација *RA* у

сваком узорку је урађена на основу површине пикова у *SRM* експерименту. Резултати су представљени као *mg* у 1 *g* суве масе узорка (*mg g⁻¹ DW*).

Услед недоступности стандарда неких једињења од интереса у нашим истраживањима, њихова идентификација је урађена поређењем добијених *UV*, *MS* и *MS/MS* спектара са литературним подацима, али и на основу фрагментационих профила сличних једињења. Такав је случај са литоспермичном Б киселином. Резултати су представљени као *mg* еквивалентне количине рузмаринске киселине (*ERA*) у *g* суве масе узорка (*mg ERA g⁻¹ DW*).

3.12. Одређивање количине флавоноида

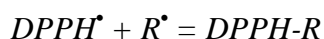
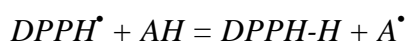
Укупни флавоноиди одређивани су спектрофотометријски, коришћењем модификоване методе коју су предложили *Karadeniz* и сар. (2005). Помешано је 100 μ l биљног екстракта (слепа проба садржи метанол), 550 μ l *ddH₂O* и 40 μ l 5% раствора *KNO₂* (Кемика, Загреб, Југославија). Смеша је потом инкубирана 6 минута на собној температури, након чега јој је додато 70 μ l 10% раствора *AlCl₃* x 6*H₂O* (Кемика, Загреб, Југославија). После инкубације у трајању од 5 минута додато је 240 μ l 1 *M* раствора *NaOH*, а затим је добијена смеша добро измешана. Апсорбанца је мерена на 510 *nm* (*HP Agilent 8453 Spektrofotometar, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA*). Количина укупних флавоноида у екстракту је одређена на основу стандардне криве, која је добијена мерењем апсорбанце различитих разблажења рутин хидрата (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Минхен, Немачка*) познате концентрације. Резултати су изражени у милиграм-еквивалентима рутин хидрата (*RE*) по граму суве масе узорка (*mg RE g⁻¹ DW*).

3.13. Одређивање антиоксидативне активности

Антиоксидативна активност заснована на способности инхибиције слободних радикала тестирана је у односу на стабилни *DPPH* радикал и у односу на катјон - радикал *ABTS* (претходно формиран хемијском оксидацијом раствора *ABTS*). Вредности су изражене преко количине антиоксиданса потребног да смањи почетну концентрацију радикала за 50%, тзв. ефикасне концентрације *IC₅₀*.

3.13.1. DPPH метода

Ова метода се заснива на способности антиоксиданаса да неутралишу (*scavenging activity*) стабилни слободни радикал 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (*DPPH*[•]) тако што га редукују. *DPPH*[•] радикал показује јаку апсорпцију у видљивом делу спектра (517 nm) захваљујући неспареном валентном електрону на једном атому азотне везе (*Eklund* и сар., 2005). У реакцији са „хватачем“ слободних радикала (антиоксидансом из узорка - *AH*) *DPPH*[•] се редукује у *DPPH-H*, при чему долази до обезбојавања узорка (*Blois*, 1958).



Према модификованој методи коју су дали *Brand-Williams* и сар. (1995), направљена је реакциона смеша, концентрације 200 μM *DPPH* (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim*, Немачка) у метанолу. Раствор је чуван у тамној боци, пошто је изразито нестабилан на светлости (*Ozcelik* и сар., 2006), а сви остали кораци при мерењу су извођени под пригушеним светлом. Количина од 50 μl биљног екстракта растворена је у 450 μl метанола и помешана са 500 μl свеже припремљеног раствора *DPPH*. На овај начин је коначна концентрација реакционе смеше у анализираном узорку износила 100 μM *DPPH* (препоручено по *Molyneux*, 2004). Након инкубације узорка на собној температури у мраку, у трајању од 30 минута, мерена је апсорбанца смеше на 517 nm (*HP Agilent 8453 Spektrofotometar, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA*). Да би се смањила грешка настала променом апсорбанце нестабилног *DPPH*[•] радикала у раствору (апсорбанца је стабилна око 30 минута, према *Sharma* и *Bhat* (2009)), слепа проба је мерена пре сваког сета од 30 узорака.

Способност „неутрализације“ слободних радикала је изражена помоћу ефикасне концентрације IC_{50} , која се дефинише као количина антиоксиданса потребна да смањи почетну концентрацију *DPPH*[•] радикала за 50%. Ниске IC_{50} вредности карактеришу високу антиоксидативну активност узорка, и обратно. У циљу одређивања IC_{50} вредности коришћена је серија од 4 разблажења сваког

узорка, а добијене вредности процента инхибиције $DPPH^{\bullet}$ радикала у зависности од концентрације екстракта су представљене графички. Вредност ефикасне концентрације узорка која је потребна за редукцију 50% $DPPH^{\bullet}$ радикала (IC_{50}) добијена је на основу линеарне регресионе анализе добијених резултата. За поређење антиоксидативног потенцијала испитиваних узорака одређивана је способност „неутрализације” слободних $DPPH^{\bullet}$ радикала помоћу рузмаринске киселине као референтног стандарда. Резултати су представљени као вредности IC_{50} у $mM ERA g^{-1} DW$.

3.13.2. ABTS метода

За одређивање антиоксидативне активности коришћена је модификована метода коју су описали *Re* и сарадници (1999). Ова метода се заснива на „гашењу“ – инхибицији (*scavenging activity*) катјон-радикала *ABTS* (2,2-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонске киселине) који се формира хемијском оксидацијом раствора *ABTS* (*Sigma*, Онтарио, Канада). Раствор калијум-персулфата ($K_2S_2O_8$, Техника, Загреб, Југославија) концентрације 4,9 *mM* помешан је са 7 *mM* раствором *ABTS* у односу 1:1. Смеша је инкубирана 12 - 16 сати у мраку, на собној температури.

Пре анализе раствор који садржи $ABTS^{\bullet+}$ радикале је разблажен у 80% етанолу (1:46 *v/v*) и еквилибрисан на 30 °C. Смеша је у даљем поступку разблажена толико да је приликом мерења на 734 *nm* (*HP Agilent 8453 Spektrofotometar, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA*) апсорбанца износила $0,700 \pm 0,02$. Раствор је током мерења чуван у тамној боци. Реакциона смеша је добијена мешањем 50 μl биљног екстракта са 950 μl разблаженог *ABTS* раствора (слепа проба садржи метанол). Након мешања смеша је инкубирана 10 минута на собној температури, након чега је мерена апсорбанца на 734 *nm*.

За одређивање концентрације узорка која доводи до 50% инхибиције *ABTS* радикала направљена је серија од 4 разблажења сваког узорка. $ABTS^{\bullet+}$ инхибиција (%) је представљена графички у односу на концентрацију узорка, а вредност IC_{50} добијена је помоћу линеарне регресионе анализе.

За поређење антиоксидативног потенцијала испитиваних узорака одређена је способност инхибиције слободних $ABTS^{*+}$ радикала помоћу рузмаринске киселине као референтног стандарда. Резултати су представљени као вредности IC_{50} изражене преко $mM ERA g^{-1} DW$.

3.14. Идентификација гена из пута биосинтезе рузмаринске киселине

3.14.1. Дизајнирање прајмера за изолацију гена из пута биосинтезе рузмаринске киселине

За врсту *R. umbellata* не постоје публиковане генске секвенце, тако да су прајмери за гене из пута синтезе рузмаринске киселине дизајнирани према секвенцама хомологих гена овог биосинтетичког пута из других биљних врста (Табела 4) у високо конзервисаним регионима других биљних врста.

Табела 4 Врсте коришћене за дизајн прајмера за идентификацију гена из пута биосинтезе рузмаринске киселине

Фамилија Lamiaceae:	Boraginaceae:	Остале фамилије
<i>Coleus blumei</i> = <i>Solenostemon scutellarioides</i>	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Brassicaceae)
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	<i>Arnebia euchroma</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> (Solanaceae)
<i>Salvia officinalis</i>	<i>Eritrichium sericeum</i>	<i>Lotus japonicus</i> (Fabaceae)
<i>Rosmarinus officinalis</i>		<i>Ricinus communis</i> (Euphorbiaceae)
<i>Melissa officinalis</i>		<i>Pinus taeda</i> (Pinaceae)
<i>Agastache rugosa</i>		<i>Glycine max</i> (Fabaceae)
<i>Lavandula angustifolia</i>		<i>Sesamum indicum</i> (Pedaliaceae)
<i>Ocimum basilicum</i>		<i>Catharanthus roseus</i> (Apocinaceae)
<i>Perilla frutescens</i> L		<i>Petunia x hybrida</i> (Solanaceae)
<i>Scutellaria baicalensis</i>		<i>Withania somnifera</i> (Solanaceae)
		<i>Gossypium hirsutum</i> (Malvaceae)
		<i>Populus trichocarpa</i> (Salicaceae)

За дизајн прајмера коришћени су програми *BLAST* и *BioEdit*. Где год је било могуће прајмери су дизајнирани у регионима конзервисаним код свих коришћених секвенци, а где то није било могуће консензуси су мануелно измењени и прилагођени врстама најсроднијим *R. umbellata* (односно фамилији **Boraginaceae**). У неким случајевима дизајниране су две консензусне секвенце (једна за гене хомологне фамилији **Boraginaceae**, а друга фамилији **Lamiaceae**) и прајмери прављени за обе. Прајмери су дизајнирани на основу добијених консензуса у програму *PrimerBlast*. Изузетак је ген *CYP98A*, где су за конструкцију прајмера коришћене *GenBank* секвенце *CYP98A* гена биљака *S. scutellarioides* (AJ427452) и *L. erythrorhizon* (AB017418) у региону који је означен као конзервативан (*Morant* и сар. 2002). Дизајнирано је укупно 12 парова прајмера за 8 гена биосинтетског пута *RA* (Табела 5)

Табела 5 Прајмери коришћени за изолацију гена из пута биосинтезе *RA*

Консензусна секвенца - добијена помоћу више хомологих гена претежно у конзервисаним регионима (на основу секвенци из **Lamiaceae** (Lam) и из **Boraginaceae** (Bor)). Секвенце за *CYP98* су преузете директно из *GenBank*; *F* – (*forward*) директни прајмер; *R*- (*reverse*) супротни прајмер; *Tm* – очекиване температуре топљења; Ампликон (*bp*) – очекивани број базних парова

Ензим	Консензусна секвенца	Прајмер	5' –секвенца- 3'	<i>Tm</i> (°C)	Ампликон (<i>bp</i>)
<i>PAL</i> Фенилаланин амонијум-лијаза (EC 4.3.1.24)	<i>PAL</i> 1	PAL1F	AGTTCAGGAAGCCGGTGGT	55.22	151
		PAL1R	ATAACCCAATCGCTGCTGGC	55.29	
<i>PAL</i> Фенилаланин амонијум-лијаза (EC 4.3.1.24)	<i>PAL</i> 2	PAL2F	GGTGGCTGAGTTTAGGAAACCAG	55.46	155-161
		PAL2R	CCATAACCCAATCACTACTAGCCTT	54.12	
<i>CYP73-CAH</i> Транс-цинамат 4 монооксигеназа (EC 1.14.13.11) Lamiaceae	<i>CAH</i> Lam	CAHLF	GATTGGCGCAGAGCTTCGA	55.16	228 -231
		CAHLR	TGATCTCTCCCTTCTGCTGGG	54.98	
<i>CYP73-CAH</i> Транс-цинамат 4 монооксигеназа (EC 1.14.13.11) Boraginaceae	<i>CAH</i> Bor	CAHBF	ACTGGCTCCAAGTTGGTGATG	54.64	525
		CAHBR	AGCTCTGAGCCAATCTACTCCT	54.33	
<i>4CL</i> 4-кумарат - <i>CoA</i> лигаза (EC 6.2.1.12) Lamiaceae	<i>4CL</i> Lam	4CLLF	AGCAAGTGGACGGCGAGAA	56.08	373
		4CLLR	GTCATACCATAACCCTGGCCA	53.55	
<i>4CL</i> 4-кумарат - <i>CoA</i> лигаза (EC 6.2.1.12) Boraginaceae	<i>4CL</i> Bor	4CLBF	CGGTGAGGACCGTCATGTC	54.5	140
		4CLBR	AGCCAGACACATAGCCAACAC	54.75	
<i>TAT</i> Тирозин трансминаза (EC 2.6.1.5)	<i>TAT</i>	TATF	GACTTCTGTTTCAAGCTGGCC	53.97	140
		TATR	AAAGACTTGAGCCTCTCCATGGC	56.77	
<i>HPPR</i> Хидроксипируват редуктаза (EC 1.1.1.237)	<i>HPPR</i>	HPPRF	TTAGGGTTACCAACACGCC	54.11	217
		HPPRR	GCTCGCTCAGCAACTGCTAA	55.31	
<i>RAS</i> Розмаринат синтаза (EC 2.3.1.140)	<i>RAS</i>	RASF	AAGCTCCACATCCCCTTCGA	54.94	320
		RASR	GCCTTCCCCCACCCGAA	55.5	
<i>CYP98A</i> Цитохром <i>P450</i> зависна монооксигеназа (EC 1.14.14.1) Lamiaceae	AJ427452	C98ALF	CAAGAGAAAGTGCAGGAGGAGTT	54.56	234
		C98ALR	GTCACGTGCGATGGCCATA	57.14	
<i>CYP98A</i> Цитохром <i>P450</i> зависна монооксигеназа (EC 1.14.14.1) Boraginaceae	AB017418	C98ABF	CAACGAAAGGCTCAAGAGGAACT	55.17	234
		C98ABR	ATCACGCGCAATGGCCC	55.61	
<i>CPR</i> <i>NADPH</i> :цитохром <i>P450</i> редуктаза (EC 1.6.2.4)	<i>CPR</i>	CPRF	TGGATGATTATGCTGCCGATGAT	54.34	304
		CPRR	CATTGATCATCATCTCCAAGACCCA	54.66	

3.14.2. Изолација РНК

Укупна РНК изолована је помоћу припремљеног Тризол реагенса по упутству произвођача комерцијалног TRIzol реагенса (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*).

Да би се избегла контаминација РНК-азама узорци су хомогенизовани у стерилним условима (ламинару) употребом стерилних раствора и судова, „RNase-free“ микротуба (*RNase-free, Eppendorf, Hamburg, Немачка*) и наставака са аеро филтерима. Дејонизована вода је третирана минимум 12 сати 0,05% (v/v) диетилпирокарбонатом (*DEPC*) који је снажан иреверзибилни инхибитор рибонуклеаза, а након стерилизације је коришћена за припрему раствора. Авани са тучковима пре стерилизације третирани су 3% хидрогеном 30 минута. На исти начин је пре употребе третирана кадица за електрофорезу.

Свежи зелени делови биљака су одмах након одмеравања (500 mg) хомогенизовани у течном азоту помоћу тучка и авана, а затим третирани 1 ml расхлађеног Тризол реагенса (0,8 M гуанидин тиоцијанат, 0,4 M амонијум тиоцијанат, 0,1 M натријум ацетат, pH 5, 0,5% (v/v) глицерол и 38% (v/v) фенол еквилибрисан у *Tris-HCl* пуферу, pH 8). Хомогенат је након отапања пребациван у микротубе и инкубиран 5 минута на собној температури, да би дошло до потпуне дисоцијације нуклеопротеинских комплекса. Затим је додавано 200 μ l раствора хлороформ : изоамил алкохол (24:1 v/v) и после 20 s енергичног мешања инкубирано 3 минута на собној температури. Да би раздвојили остатке ћелија од РНК, смеша је центрифугирана 10 минута на 12000 g на 4 °C. На овај начин се одвајају талог са остацима ћелија, доња фенолна фаза, изнад које је интерфаза са протеинима и горња безбојна водена фаза са РНК која је преношена у нову микротубу. Супернатанту је додавано 250 μ l изопропанола и 250 μ l раствора за преципитацију РНК (0,4 M NaCl, 0,8 M натријум цитрат, 0,8 M HCl у DEPC третираној води). Да би дошло до преципитације РНК узорци су енергично мешани 5 s и инкубирани 30 минута на - 20 °C после чега је садржај центрифугиран 10 минута на 12000 g на 4 °C. Супернатант је одстрањиван декантовањем. Талог РНК је испиран додавањем 1 ml хладног 75% етанола. Узорци са талогом РНК чувни су у етанолу на - 20 °C пошто су много стабилнији

у односу на узорке растворене у води и могу да се одрже без деградације и до годину дана.

Узорци РНК су пре коришћења центрифугирани, етанол је одбачен, а преципитат осушен у ламинату. РНК је растворена у 50 μl воде ослобођене рибонуклеаза (из ампула за инјекције).

3.14.3. Квантификација РНК

Спектрофотометријски је квантификована изолована РНК и потврђен њен квалитет. Мерена је апсорбанца узорака на 260 и 280 nm у кварцним киветама које су пре употребе, ради елиминације присутних рибонуклеаза, третиране 10 минута смешом метанол : HCl (1:1). За разблаживање узорака (100 пута) коришћен је пуфер 10 mM Tris-HCl , pH 7,5 који је уједно представљао и слепу пробу. Квалитет РНК одређен је на основу односа A_{260}/A_{280} узорака, при чему су прихватљиве вредности биле 1,9-2,1. Делимично растворени узорци или узорци контаминирани протеинима имају овај однос мањи од 1,6, док је однос већи од 2 у случају да је РНК деградирана или контаминирана. Познато је да апсорбанца на 260 nm износи 1 за узорак који има 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ РНК. Концентрација РНК у узорцима израчунава се према формули:

РНК концентрација ($\mu\text{g ml}^{-1}$) = $A_{260} \times 40 \times 100$ (фактор разблажења)

укупна РНК ($\mu\text{g ml}^{-1}$) = $(40 \mu\text{g ml}^{-1} \times A_{260} \times \text{разблажење})/1000 = 4 \times A_{260}$

3.14.4. Одређивање квалитета РНК

Електрофоретским раздвајањем молекула укупних РНК провераван је квалитет изолованих РНК на 2% агарозном гелу у 1 \times TBE пуферу (89 mM Tris , 89 mM борна киселина, 2 mM EDTA) са 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ етидијум бромидом и при константном напону од 120 V. Око 2 μg раствора РНК помешано је са 5 μl пуфера за узорке (6X DNA Loading Dye, #R0611, Fermentas) и наношено на гел. Коришћена је хоризонтална кадица BlueMarine™ 10 SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Немачка и извор напајања Standard Power Pack P25, Biometra®,

Goettingen, Немачка. Добијени гелови су фотографисани у UV- трансилуминатору (*Quantum-ST4 3026-WL/26M, Vilber Lourmat, Torcy, Француска*)

3.14.5. Третман дезоксирибонуклеазом

Контаминација геномском ДНК је уклоњена из РНК изолата помоћу ензима дезоксирибонуклеазе I (*DNase I, #EN0521, Fermentas*) према упутству произвођача. Запремина реакционе смеше је износила 10 μ l (Табела 6).

Табела 6 Састав реакционе смеше за третман ДНК-азом

Компоненте	μ l
РНК (2 μ g) у DEPC-води	6,5
DEPC-вода	
10 \times реакциони пуфер са MgCl ₂ за ДНК-азу I (<i>Fermentas</i>)	1,0
ДНК-аза I (#EN052, <i>Fermentas</i> , 1 U μ l ⁻¹)	2,0
Инхибитор РНК-азе RiboLock™ (#EO0381, <i>Fermentas</i> , 40 U μ l ⁻¹)	0,5
Укупно	10,0

Реакције су инкубиране у PCR-машини *peqSTAR 96 Universal Gradient* (*Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Немачка*). Након инкубације од 30 минута на 37 °C у смешу је додавано по 1 μ l 2,5 mM EDTA да би током следећих 10 минута температура инкубације била повећана на 65 °C када долази до инактивације ДНК-азе. Добијено је 11 μ l раствора у коме се налази 2 μ g РНК по узорку, која је даље коришћена у реакцији реверзне транскрипције.

3.14.6. Реакција реверзне транскрипције (RT) – синтеза првог ланца

Реакција реверзне транскрипције (RT) урађена је помоћу *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit-a* (#K1622, *Fermentas*) коришћењем олиго (dT)₁₈

прајмера и одговарајућих компоненти према упутству произвођача (Табела 7). Реакције су инкубиране 60 минута на 42 °C. Реверзна транскриптаза деактивирана је загревањем узорака 5 минута на 70 °C. Добијена једноланчана *cDNA*, која одговара количини РНК од 100 ng μl^{-1} , чувана је на – 70 °C.

Табела 7 Састав реакционе смеше *RT* реакције

Компоненте	μl
РНК (2 μg) након третмана ДНК-азом	11
Олиго (<i>dT</i>) ₁₈ прајмери	1
5× реакциони пуфер	4
<i>RiboLock</i> [™] инхибитор РНК-азе (20 U μl^{-1})	1
<i>dNTP</i> микс (10 mM)	2
<i>RevertAid</i> [™] <i>M-MuLV</i> реверзна транскриптаза (200 U μl^{-1})	1
Укупно	20

3.15. Оптимизација *PCR* протокола

Да би се добило што специфичније умножавање, са што бољим приносом реакције и искључењем неспецифичних трака (очекиваних при коришћењу прајмера дизајнираних на основу консензусних секвенци и хомологих гена), приступило се обимној оптимизацији *PCR* протокола, базираној на проналажењу оптималне температуре спаривања прајмера (*Ta* – *annealing*) и додавању одговарајућих адитива.

3.15.1. Оптимизација температуре спаривања прајмера (*Ta* – *annealing*) за *PCR*

За оптимизацију је коришћена тотална РНК изолована из свежих изданака *R. umbellata* гајених *in vitro* поступком описаним у поглављу 3.4. Након третмана ДНК-зом (поглавље 3.14.5) и реверзне транскрипције (поглавље 3.14.6) постављане су *PCR* реакције. Дизајнирани прајмери амплификовани су помоћу

рекомбинантне *Taq* ДНК полимеразе (#EP0401, *Fermentas*) по протоколу датом у Табели 8.

Табела 8 Састав реакционе смеше за *PCR*

Компоненте	μl
10x <i>Taq</i> пуфер са $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5
<i>dNTP</i> микс (10 mM)	0,5
25 mM MgCl_2	2,0
микс прајмера F и R, 7,5 μM сваки	3,3
<i>Taq</i> (5U μl^{-1} ; recombinant)	0,4
матрица (<i>cdNA</i> из реакције <i>RT</i> , 100 ng μl^{-1})	1,0
вода, <i>nuclease-free</i>	15,3
Укупно	25,0

За сваки пар прајмера вариране су 4 температуре спаривања (53, 53,4, 55 и 57,1 °C).

За *PCR* реакције коришћена је *PCR* машина са температурним градијентом *reqSTAR 96* програмирана према Табели 9

Табела 9 Програм за *PCR*

Кораци	$T^\circ\text{C}$	Време	Број циклуса
Иницијална денатурација	95	10 min	1
Денатурација	95	15 s	40
Везивање прајмера	53 /53,4 /55/ 57,1	30 s	
Издуживање	72	30 s	
Финално издуживање	72	10 min	1
Чување	4	∞	1

3.15.2. Оптимизација *PCR* применом адитива

Да би амплификација била што специфичнија испробани су различити *PCR* адитиви. Састав реакционе смеше за *PCR* из Табеле 8 промењен је смањењем количине воде и додавањем одговарајуће количине адитива као што је дато у Табели 10.

Табела 10 Адитиви коришћени за оптимизацију *PCR* реакције

Адитив	μl
Формаид (500 mM)	2,5
<i>DMSO</i> (5%)	2,5
Глицерол (5%)	2,5
Етиле гликол (1M)	2,5
Трехалоза (0,2M)	2,5
<i>BSA</i> (говеђи албумински серум; $0,2 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$)	2,5
<i>Tween-20</i> (0,5%)	2,5
<i>Enhancer Solution P</i> (1x; <i>PEQLAB Ltd., UK</i>)	5,0

3.16. Припрема биљног материјала за светлосну микроскопију (парафинска метода)

За фиксацију материјала коришћен је фиксатив *FAA* (5 ml глацијална сирћетна киселина, 10 ml 37% формалдехид и 85 ml 70% етанол). Због дебљине материјала, ради бољег продирања фиксатива, узорци су 14 дана држани на температури од 4 °C. По завршеној фиксацији материјал је испиран шест пута дестилованом водом у трајању од 2 сата након чега је поступно дехидриран спровођењем кроз серију алкохола растућих концентрација (30 - 100% етанол).

Ради просветљавања ткива након дехидратације, узорци су држани 15 минута у ксилолу (*Zorka Pharma*, Шабац, Србија). Материјал је укалупљен у парафин (*Histowax*, *Histolab Products AAB*, *Goteborg*, Шведска, тачка топљења 58 °C) и сечен на ротационом микротону (*Leica*, Немачка) на пресеке дебљине 7 -

10 μm . Пресеци су након депарафинизације, рехидратације и бојења у хематоксилину инклузирани у канада балзам (*Molar Chemicals KFT*, Будимпешта, Мађарска). За посматрање и снимање коришћен је светлосни микроскоп *Axio Vert* (*Carl Zeiss*).

3.17. Статистичка обрада података и приказивање резултата

За статистичку обраду података коришћен је софтвер *STATGRAPHICS*, верзија 4,2 (*STSC Inc. and Statistical Graphics Corporation, Orem, UT*). Подаци су подвргнути једнофакторској анализи варијансе (*ANOVA*), а поређења средњих вредности параметара су вршена помоћу *Fisher's LSD (least significant difference)* теста најмање статистички значајних разлика, са нивоом значајности од $p \leq 0.05$. Процентуални подаци су пре статистичке обраде трансформисани у нумеричке функцијом *arcsin*, а након обраде су поново превођени у проценте ради графичког приказа. Различита слова која прате нумеричке вредности указују на статистички значајне разлике. Графичка обрада података урађена је помоћу програма *Microsoft Office Excel*.

4 РЕЗУЛТАТИ

4.1. Морфогенеза незрелих зиготских ембриона *Rindera umbellata in vitro*

4.1.1. Успостављање *in vitro* културе

Незрела семена (Слика 17 А и Б) су била извор материјала за успостављање *in vitro* културе.



Слика 17 Незрела семена (А - на биљци; Б – појединачна семена).

Култура незрелих ембриона успостављена је на МС подлози са 30 g l^{-1} сахарозе. Након 10 дана проклијало је 72% ембриона (Слика 18). За даље гајење клијанци су преношени у ерленмајере са истим саставом подлоге.



Слика 18 Незрели ембриони након 10 дана раста на МС подлози са 30 g l^{-1} сахарозе (↑ - радикула).

Почетни пасажии трајали су 4 недеље без мултипликације. Продужавањем трајања пасажа на 5 недеља запажена је спорадична појава аксиларних пупољака. Адвентивни пупољци се нису формирали.

Приликом наредних пасажа биљкама су пре пребацивања на свежу подлогу одстрањивани коренови.

4.1.2. Индукција појаве адвентивних и аксиларних пупољака

За индукцију појаве адвентивних пупољака коришћене су две различите подлоге. Прва је била МС подлога са 30 g l^{-1} сахарозе, $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ ВАР и $0,25 \text{ mg l}^{-1}$ IAA, а друга МС подлога са 30 g l^{-1} сахарозе, 1 mg l^{-1} ВАР и $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IAA. Након 4 недеље сви експлантати су формирали адвентивне пупољке (Табела 11). Пошто се на другом типу подлоге образовао већи број пупољака по експлантату, ова комбинација регулатора растења је одабрана за даљу мултипликацију. У свим експериментима коришћени су адвентивни изданци формирани на датој подлози, а њихов број је износио у просеку 5 до 6 пупољака по експлантату (Слика 19).

Табела 11 Процент појаве адвентивних пупољака након четири недеље растења на МС подлози са 30 g l^{-1} сахарозе, ВАР и IAA.

ВАР (mg l^{-1})	IAA (mg l^{-1})	%
0,5	0,25	100
1	0,5	100



Слика 19 Адвентивни изданци на МС подлози са 30 g l^{-1} сахарозе, 1 mg l^{-1} ВАР и $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IAA после 4 недеље.

Утицај шећера на развој биљака праћен је на подлогама без хормона. Пораст садржаја шећера у подлози за гајење праћен је повећањем појаве и броја адвентивних пупољака, осим при највишој концентрацији на којој не долази до њиховог формирања (Табеле 12 и 13). Ниво сахарозе од 0,06 *M* у подлози довео је до максималне појаве адвентивних пупољака од 38,77%, при чему се максималан број пупољака од 2,44 по експлантату образовао при концентрацији глукозе од 0,3 *M*. Највише пупољака по експлантату код биљака гајених под утицајем фруктозе формирао се при концентрацији 0,03 *M* (Табела 13).

Код свих примењених концентрација и врста шећера добијен је мали број адвентивних пупољака и није забележена појава аксиларних пупољака.

Табела 12 Процент појаве адвентивних пупољака на експлантату након четири недеље растења на хранљивој подлози са сахарозом, глукозом и фруктозом. Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 90 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

концентрација (<i>M</i>)	сахароза	глукоза	фруктоза
0,003	5,02 ± 2,69 <i>абв</i>	7,16 ± 2,87 <i>абвг</i>	7,04 ± 3,02 <i>абвг</i>
0,01	7,54 ± 3,68 <i>абвг</i>	4,29 ± 2,02 <i>абв</i>	10,02 ± 2,12 <i>абвг</i>
0,03	6,32 ± 4,25 <i>абвг</i>	7,18 ± 3,62 <i>абвг</i>	17,25 ± 5,52 <i>вгдђ</i>
0,06	38,77 ± 8,86 <i>е</i>	16,15 ± 8,15 <i>вгдђ</i>	13,18 ± 5,06 <i>бвгд</i>
0,1	18,91 ± 4,91 <i>гдђ</i>	24,60 ± 6,70 <i>дђ</i>	18,11 ± 3,37 <i>гдђ</i>
0,3	22,71 ± 5,08 <i>дђ</i>	27,43 ± 12,24 <i>ђе</i>	2,00 ± 1,33 <i>аб</i>
1	0,00 ± 0,00 <i>а</i>	0,00 ± 0,00 <i>аб</i>	0,00 ± 0,00 <i>а</i>

Табела 13 Просечан број адвентивних пупољака по експлантату након четири недеље растења на хранљивој подлози са сахарозом, глукозом и фруктозом. Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 90 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

концентрација (<i>M</i>)	сахароза	глукоза	фруктоза
0,003	1,00 ± 0,00 <i>абв</i>	2,20 ± 0,58 <i>бвгдђ</i>	1,14 ± 0,14 <i>бв</i>
0,01	1,00 ± 0,00 <i>абв</i>	1,00 ± 0,00 <i>абвгд</i>	1,20 ± 0,13 <i>бв</i>
0,03	1,20 ± 0,20 <i>бвгд</i>	1,20 ± 0,20 <i>бвгд</i>	1,88 ± 0,21 <i>дђ</i>
0,06	1,61 ± 0,14 <i>вгд</i>	1,45 ± 0,25 <i>бвгд</i>	1,77 ± 0,26 <i>бвгд</i>
0,1	1,60 ± 0,21 <i>бвгд</i>	1,82 ± 0,26 <i>гд</i>	1,39 ± 0,16 <i>бвг</i>
0,3	1,17 ± 0,09 <i>б</i>	2,44 ± 0,28 <i>ђ</i>	1,50 ± 0,50 <i>бвгдђ</i>
1	0,00 ± 0,00 <i>а</i>	0,00 ± 0,00 <i>а</i>	0,00 ± 0,00 <i>а</i>

Третман биљака различитим концентрацијама GA_3 није утицао на формирање адвентивних и аксиларних пупољака (резултати нису приказани).

Са повећавањем концентрације JA повећавала се учесталост појаве адвентивних пупољака, осим у присуству $200 \mu M JA$, при којој је долазило до инхибиције овог процеса у свим временским третманима (**Табела 14 А%**). Стимулаторни ефекат JA посебно је уочен након опоравка биљака на подлогама без хормона. Највећи проценат образованих пупољака (80,86%) имале су биљке које су расле 14 дана на претретману од $100 \mu M JA$ (**Табела 14 Б%**). Након опоравка биљака са свих временских претретмана од $200 \mu M JA$ превазиђена је инхибиција до нивоа контролне групе.

Број пупољака по експлантату није се значајно мењао под дејством JA (**Табела 14 А**), а ни након опоравка. Максималан број пупољака (2,3) забележен је на опоравку од једнодневнoг претретмана $50 \mu M JA$ (**Табела 14 Б**).

Аксиларни пупољци појављивали су се спорадично и у малом броју тек у четвртој недељи гајења биљака у експерименту са JA (**Табела 15 А%**). Третман од 14 дана (шеста недеља гајења) при концентрацији од $25 \mu M JA$ утицао је на формирање 3,75 пупољака по експлантату са учесталошћу од 10,96% (**Табела 15 А% и А**).

Образовање аксиларних пупољака било је чешће и бројније код старијих биљака на опоравку, и то код оних које су претходно дуже биле изложене концентрацијама JA од 50 и $100 \mu M$. Максимална појава аксиларних пупољака од 63,23% забележена је након опоравка од претретмана који је трајао 14 дана при концентрацији од $100 \mu M$ (**Табела 15 Б%**) на којој се образовало 3,15 пупољака по експлантату. Ово би био и оптимални третман за добијање аксиларних пупољака (**Табела 15 Б% и Б**).

Табела 14 Процент појаве и број адвентивних пупољака на експлантату непосредно након третмана јасмонском киселином у трајању од 1 до 14 дана (А) и након опоравка на МС подлози са 0,1 М сахарозом без хормона у трајању од 14 дана (Б). Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$). Статистички значајне разлике ($p \leq 0,05$) између вредности из третмана са ЈА и третмана опоравка означене су црвено.

третман		А%	Б%	А	Б
период гајења	концентрација ЈА (μM)	% појаве адвентивних пупољака	% појаве адвентивних пупољака	број адвентивних пупољака	број адвентивних пупољака
1 дан	0	29,78 \pm 11,77 <i>абвг</i>	42,04 \pm 5,98 <i>аб</i>	1,33 \pm 0,19 <i>аб</i>	1,25 \pm 0,13 <i>а</i>
	25	38,63 \pm 11,16 <i>вг</i>	36,45 \pm 2,68 <i>а</i>	1,65 \pm 0,26 <i>б</i>	1,18 \pm 0,12 <i>а</i>
	50	49,75 \pm 12,15 <i>г</i>	69,30 \pm 7,23 <i>вг</i>	1,65 \pm 0,15 <i>б</i>	2,30 \pm 0,31 <i>б</i>
	100	45,53 \pm 5,27 <i>г</i>	68,30 \pm 10,89 <i>вг</i>	1,33 \pm 0,13 <i>аб</i>	1,60 \pm 0,18 <i>а</i>
	200	7,54 \pm 3,68 <i>аб</i>	57,57 \pm 7,80 <i>бв</i>	1,33 \pm 0,33 <i>аб</i>	1,76 \pm 0,25 <i>аб</i>
2 дана	0	31,76 \pm 12,15 <i>абвг</i>	63,39 \pm 2,49 <i>бвг</i>	1,25 \pm 0,18 <i>аб</i>	1,76 \pm 0,24 <i>аб</i>
	25	31,28 \pm 9,48 <i>бвг</i>	56,94 \pm 11,75 <i>бв</i>	1,40 \pm 0,13 <i>аб</i>	1,75 \pm 0,32 <i>аб</i>
	50	36,08 \pm 9,54 <i>бвг</i>	55,21 \pm 3,98 <i>абв</i>	1,08 \pm 0,08 <i>а</i>	1,50 \pm 0,16 <i>а</i>
	100	30,24 \pm 7,68 <i>абвг</i>	55,93 \pm 7,90 <i>абв</i>	1,50 \pm 0,22 <i>аб</i>	1,44 \pm 0,20 <i>а</i>
	200	10,05 \pm 3,80 <i>абв</i>	54,77 \pm 9,54 <i>абв</i>	1,00 \pm 0,00 <i>аб</i>	1,43 \pm 0,17 <i>а</i>
14 дана	0	15,95 \pm 6,81 <i>абв</i>	45,25 \pm 5,80 <i>аб</i>	1,40 \pm 0,40 <i>аб</i>	1,44 \pm 0,18 <i>а</i>
	25	33,56 \pm 14,99 <i>бвг</i>	40,50 \pm 9,02 <i>аб</i>	1,56 \pm 0,29 <i>аб</i>	1,25 \pm 0,16 <i>а</i>
	50	47,04 \pm 19,52 <i>г</i>	79,95 \pm 21,83 <i>г</i>	1,27 \pm 0,14 <i>аб</i>	1,23 \pm 0,17 <i>а</i>
	100	12,83 \pm 6,93 <i>абв</i>	80,86 \pm 1,45 <i>г</i>	1,50 \pm 0,50 <i>аб</i>	1,82 \pm 0,21 <i>аб</i>
	200	2,52 \pm 2,52 <i>а</i>	56,89 \pm 5,02 <i>абв</i>	1,00 \pm 0,00 <i>аб</i>	1,78 \pm 0,21 <i>аб</i>

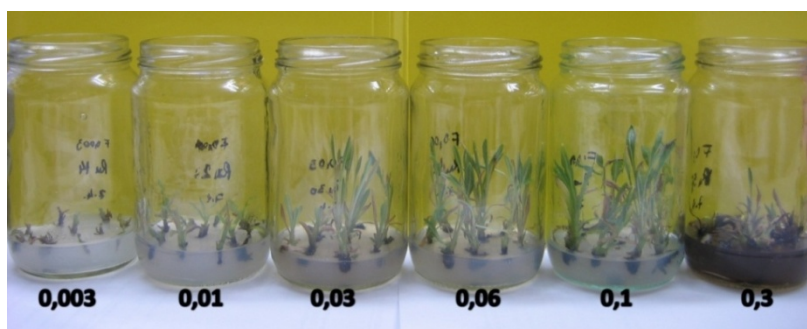
Табела 15 Процент појаве и број аксиларних пупољака на експлантату непосредно након третмана јасмонском киселином у трајању од 1 до 14 дана (А) и након опоравка на МС подлози са 0,1 М сахарозом без хормона у трајању од 14 дана (Б). Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$). Статистички значајне разлике ($p \leq 0,05$) између вредности из третмана са ЈА и третмана опоравка означене су црвено.

третман		A%	B%	A	B
период гајења	концентрација ЈА (μM)	% појаве аксиларних пупољака	% појаве аксиларних пупољака	број аксиларних пупољака	број аксиларних пупољака
1 дан	0	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	10,90 \pm 4,94 <i>абв</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	1,67 \pm 0,67 <i>абвг</i>
	25	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	6,14 \pm 3,91 <i>аб</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	1,50 \pm 0,50 <i>абвгд</i>
	50	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>
	100	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>
	200	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	23,42 \pm 3,50 <i>бвг</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	1,57 \pm 0,30 <i>абв</i>
2 дана	0	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	13,67 \pm 8,66 <i>абв</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	1,83 \pm 0,48 <i>абвг</i>
	25	5,11 \pm 3,68 <i>аб</i>	14,38 \pm 7,04 <i>абв</i>	1,33 \pm 0,33 <i>б</i>	2,00 \pm 0,71 <i>абвгд</i>
	50	4,03 \pm 2,68 <i>аб</i>	17,54 \pm 3,62 <i>абв</i>	1,50 \pm 0,50 <i>б</i>	1,80 \pm 0,37 <i>абвг</i>
	100	2,01 \pm 2,01 <i>a</i>	24,39 \pm 6,30 <i>бвгд</i>	1,00 \pm 0,00 <i>аб</i>	3,63 \pm 0,71 <i>д</i>
	200	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	30,95 \pm 7,63 <i>вгд</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	2,00 \pm 0,33 <i>бвг</i>
14 дана	0	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	5,03 \pm 5,03 <i>аб</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	4,00 \pm 0,00 <i>бвгд</i>
	25	10,96 \pm 4,55 <i>в</i>	10,05 \pm 5,81 <i>абв</i>	3,75 \pm 0,85 <i>в</i>	3,50 \pm 2,50 <i>бвгд</i>
	50	8,82 \pm 4,35 <i>бв</i>	45,68 \pm 21,79 <i>дђ</i>	1,00 \pm 0,00 <i>б</i>	3,00 \pm 0,72 <i>вгд</i>
	100	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	63,23 \pm 8,56 <i>ђ</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	3,15 \pm 0,50 <i>гд</i>
	200	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	38,40 \pm 13,64 <i>гд</i>	0,00 \pm 0,00 <i>a</i>	1,45 \pm 0,21 <i>аб</i>

4.1.3. Ефекат угљених хидрата на морфогенезу и растење адвентивних изданака

Адвентивни пупољци формирани на подлози за мултипликацију после 6 недеља су били довољно развијени да се могу користити у експериментима. Они су имали различит број формираних листова и веома варијабилну висину. Да би експериментални материјал био униформан одсецани су сви листови заједно са пупољцима у пазуху и на хранљиву подлогу преношени огољени одсечци стабла дужине 10 *mm*.

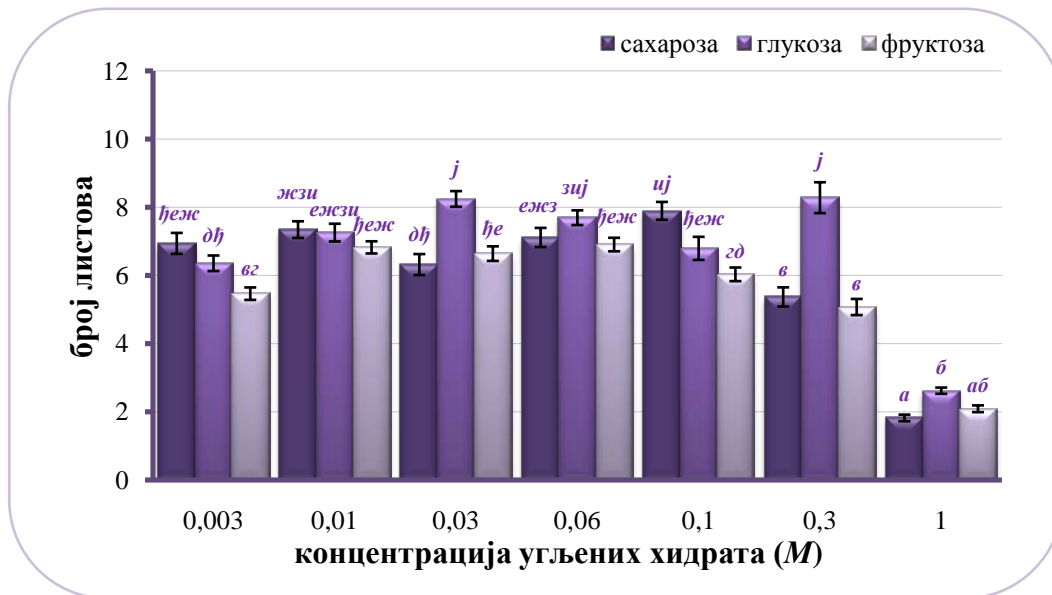
Ефекат сахарозе, глукозе и фруктозе испитиван је у одвојеним експериментима на МС подлози којој су додавани поједини шећери у опсегу концентрација од 0,003 до 1 *M* (Слика 20).



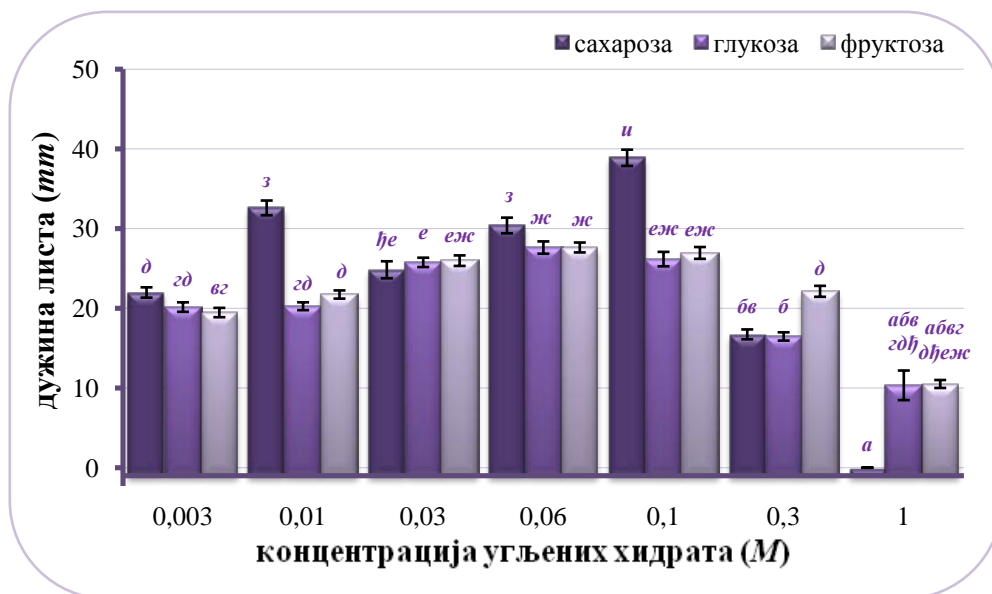
Слика 20 Биљке гајене на различитим концентрацијама фруктозе (0,003-0,3*M*).

Услови у којима су биљке расле значајно су утицали на њихову морфогенезу и растење. У експерименту је највећи број листова по експлантату (8,27) био формиран на подлози са глукозом концентрације 0,3 *M* (Слика 21), док су најдужи листови просечне величине од 38,87 *mm* образовани на подлози са сахарозом концентрације 0,1 *M* (Слика 22), на којој је забележена и највећа продукција свеже масе од 0,21 *g* по експлантату (Слика 23 А). Биљке гајене на подлози са фруктозом имале су максималне вредности свих параметара при концентрацији од 0,06 *M* где је формирано просечно 6,9 листова у розети, дугих 27,62 *mm* и са 0,095 *g* свеже масе (Слика 21, 22 и 23 А). Код свих примењених шећера концентрација од 1 *M* у подлози је утицала инхибиторно на све праћене параметре раста. Однос суве и свеже масе биљака показује да на вишим

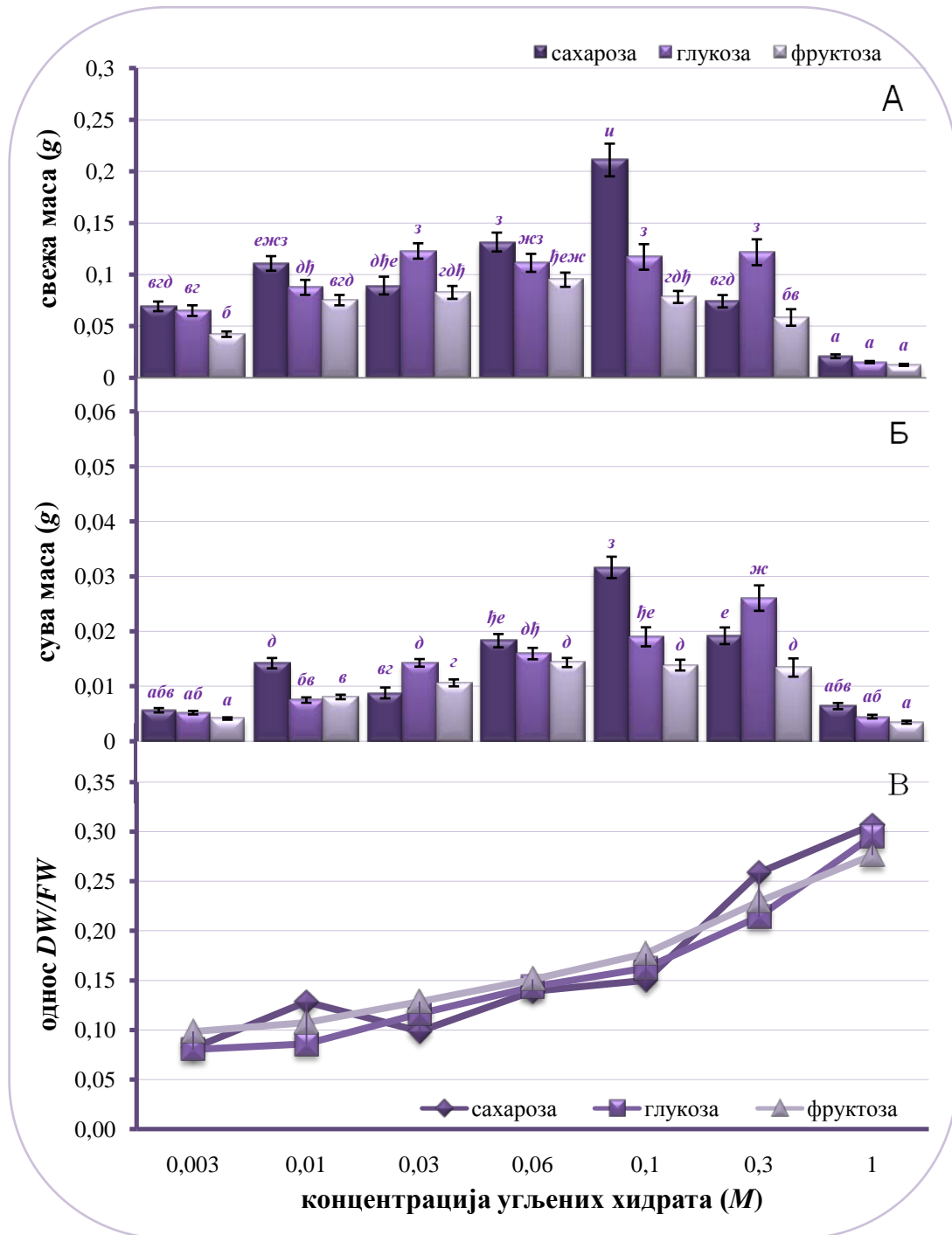
концентрацијама угљених хидрата долази до веће дехидратације ткива код свих примењених шећера (Слика 23 В).



Слика 21 Број листова у розети након четири недеље растења на хранљивој подлози са сахарозом, глукозом и фруктозом. Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 90 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).



Слика 22 Дужина листа у розети након четири недеље растења на хранљивој подлози са сахарозом, глукозом и фруктозом. Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 90 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).



Слика 23 Свежа маса (A), сува маса изданака (Б) и однос суве (DW) и свеже масе (FW) (B) након четири недеље растења на хранљивој подлози са сахарозом, глукозом и фруктозом. Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 90 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

4.1.4. Ефекат GA_3 на морфогенезу и растење адвентивних изданака

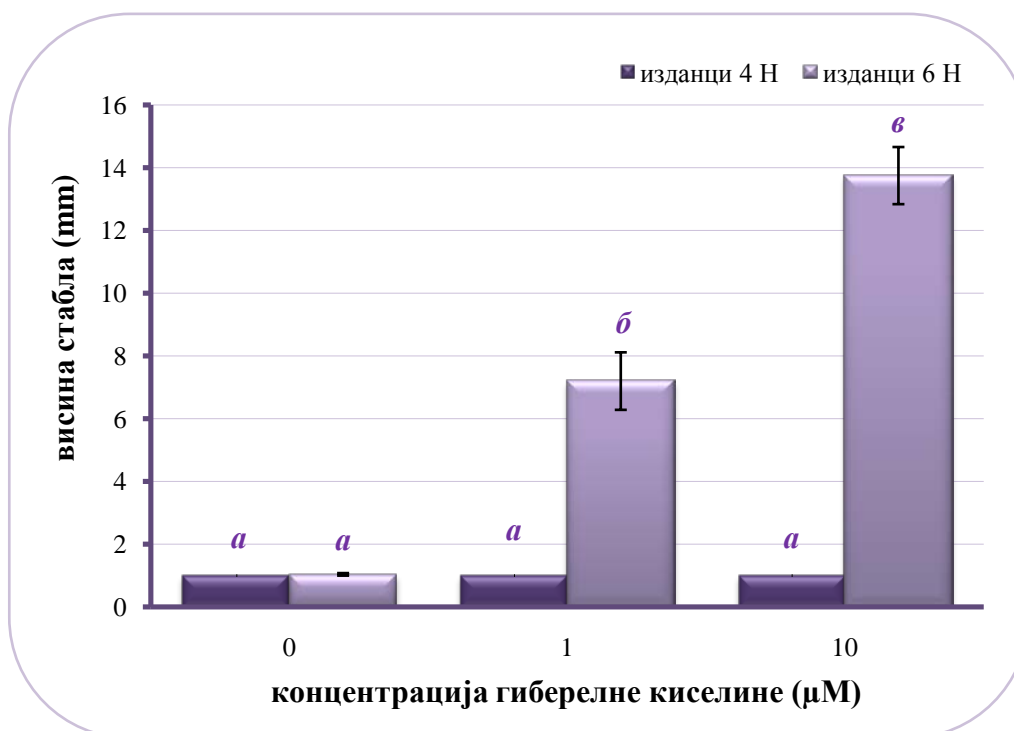
Ефекат GA_3 на издуживање стабла уочава се тек након шесте недеље гајења (Слика 24). Висина стабла расте са повећањем концентрације GA_3 захваљујући повећању броја интернодија и њиховом издуживању до вредности од 13,75 mm на 10 μM GA_3 (Табела 16 и Слика 25) Висина стабла у контролној групи је износила 1 mm. Издуживање стабла није запажено на другим третманима.



Слика 24 Биљак гајене 6 недеља на МС подлози са 30 g l⁻¹ сахарозе: А) без додатка хормона; Б) са додатком 10 μM GA_3 ; В) повећан број интернодија (деталји стабла (1,6 x)).

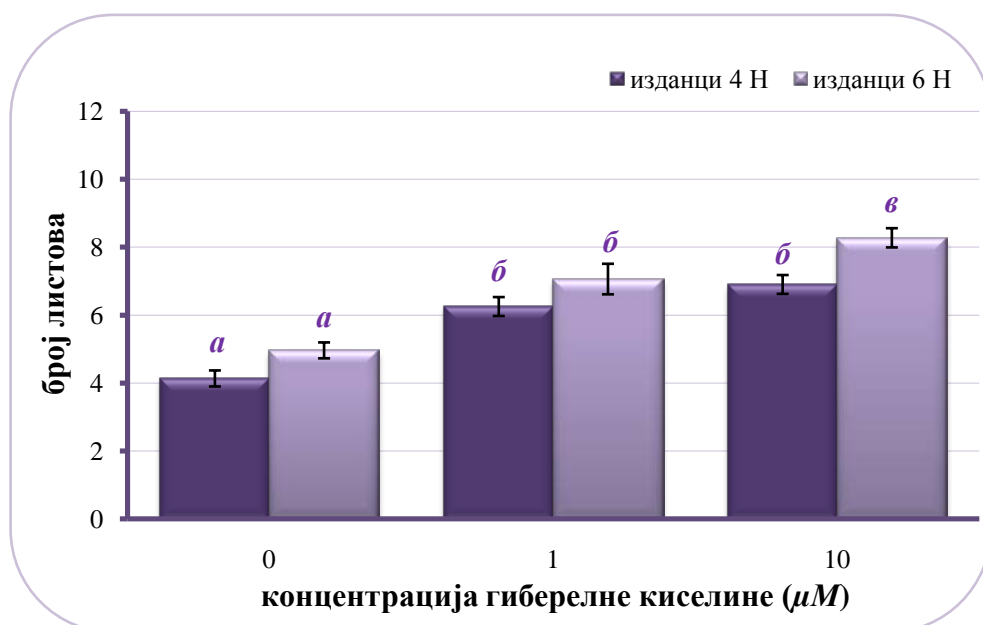
Табела 16 Број интернодија након четири и шест недеља растења на хранљивој подлози са различитим концентрацијама GA_3 . Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

концентрација GA_3 (μM)	4 недеље			6 недеља		
0	0,00	\pm 0,00	<i>a</i>	1,00	\pm 0,00	<i>a</i>
1	0,00	\pm 0,00	<i>a</i>	3,59	\pm 0,34	<i>б</i>
10	3,00	\pm 0,00	<i>абв</i>	4,55	\pm 0,20	<i>в</i>

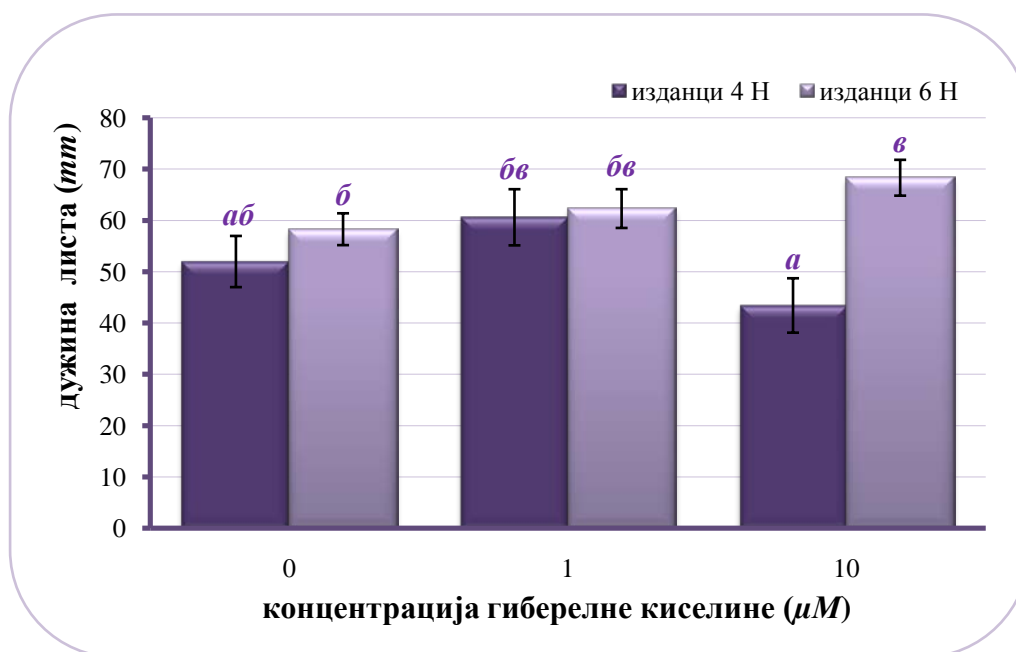


Слика 25 Просечна висина стабла након четири (4 Н) и шест недеља (6 Н) растења на хранљивој подлози са различитим концентрацијама GA_3 . Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

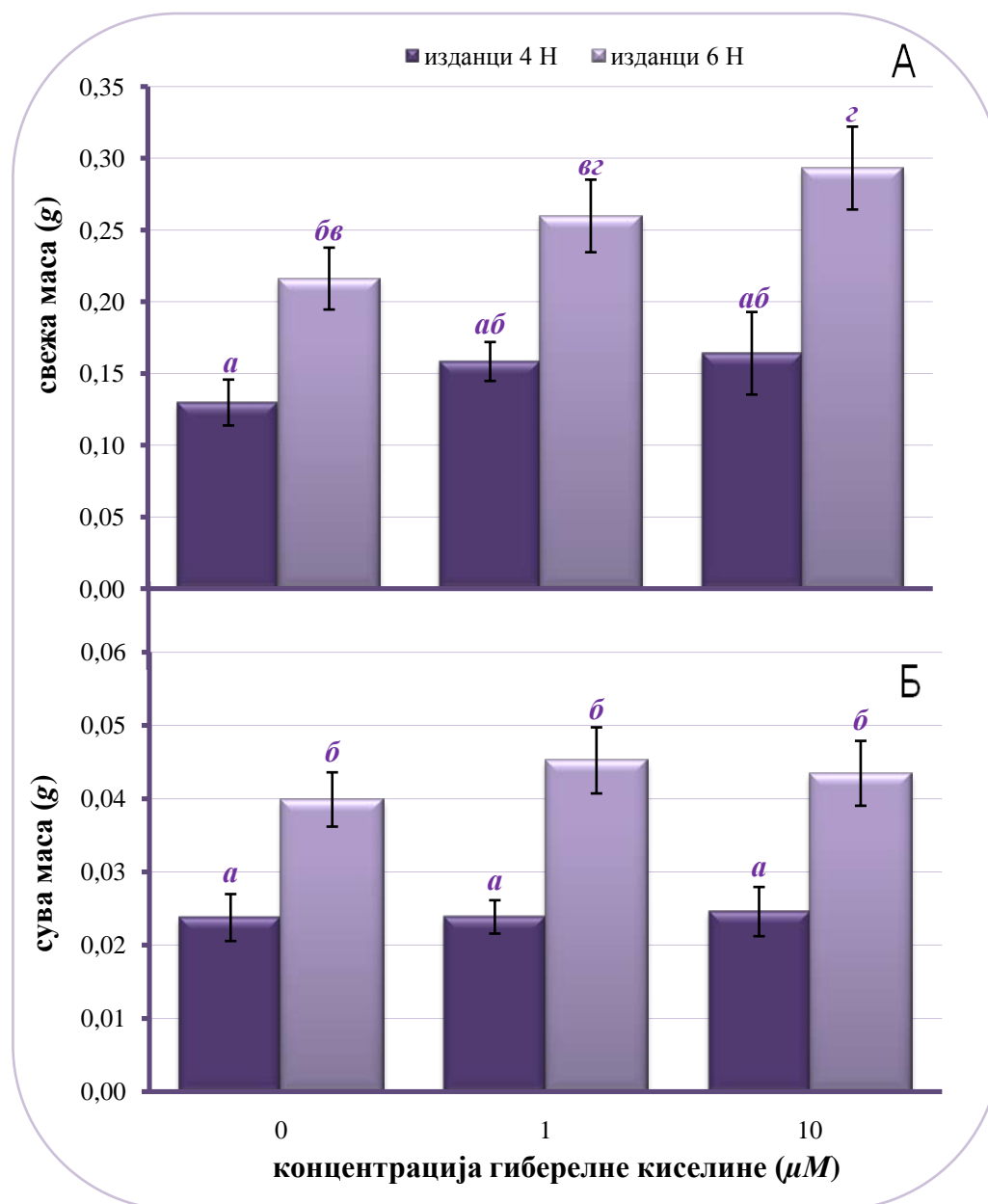
Повећањем концентрације GA_3 у подлози уочено је статистички значајно повећање броја образованих листова до максималних 8,27 на концентрацији од $10 \mu\text{M}$ GA_3 након 6 недеља гајења (Слика 26). При овој концентрацији је забележена и највећа дужина листа од 68,33 mm што је за 10 mm дуже од листова контролних биљака (Слика 27). У овим условима гајења вредности свеже и суве масе су биле највише (0,29 g, односно 0,043 g по експлантату; Слика 28 А и Б).



Слика 26 Број листова у розети након четири (4 Н) и шест недеља (6 Н) растења на хранљивој подлози са различитим концентрацијама GA_3 . Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).



Слика 27 Дужина најдужег листа у розети након четири (4 Н) и шест недеља (6 Н) растења на хранљивој подлози са различитим концентрацијама GA_3 . Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).



Слика 28 Свежа (А) и сува (Б) маса изданака након четири (4 Н) и шест недеља (6 Н) растења на хранљивој подлози са различитим концентрацијама GA_3 . Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

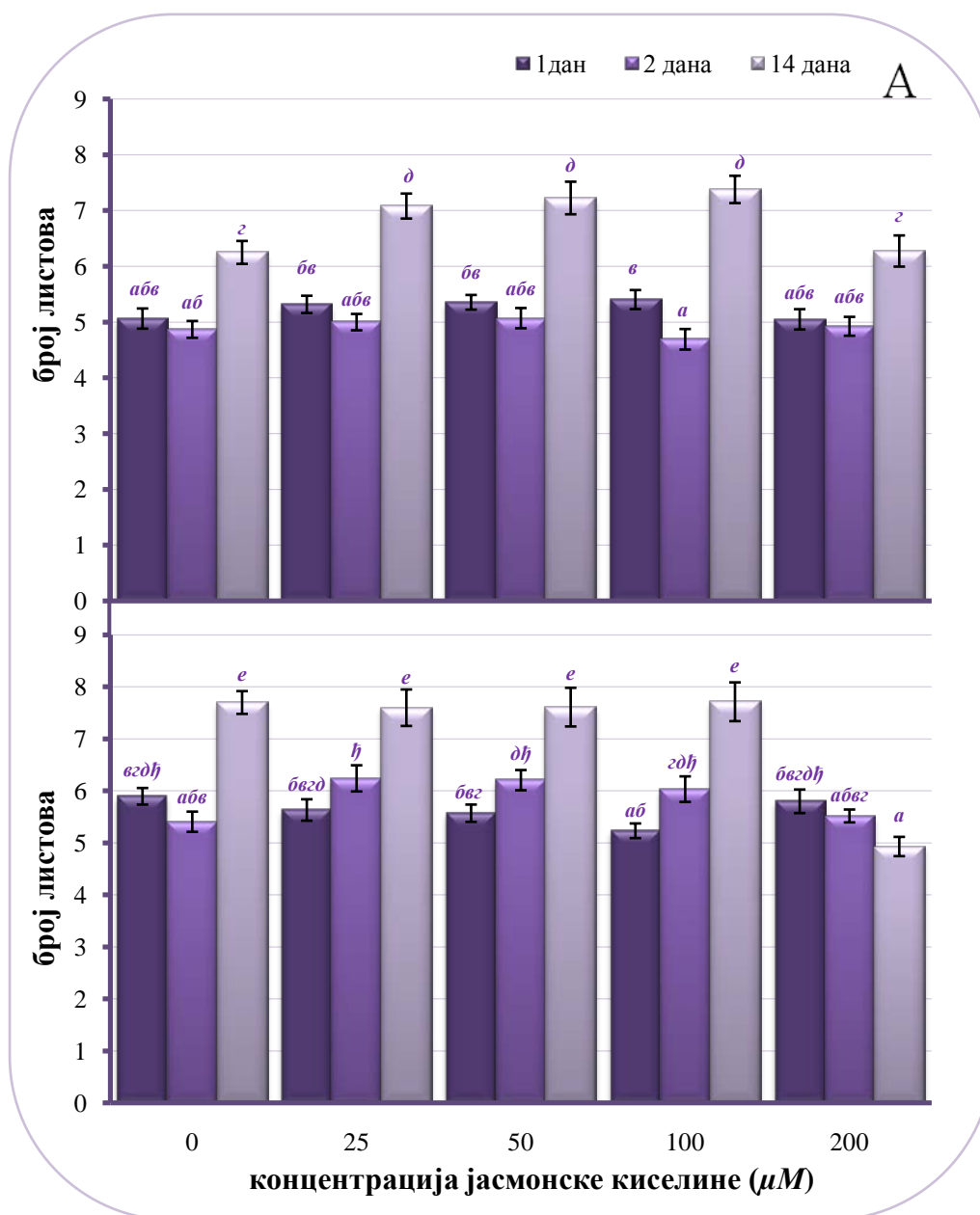
4.1.5. Ефекат *JA* на морфогенезу и растење адвентивних изданака

Утицај повећаних концентрација *JA* на морфолошке карактеристике биљака праћен је у три временска третмана, након чега је праћен и опоравак биљака на подлогама без регулатора растења у трајању од 14 дана.

Број образованих листова не мења се значајно након краткотрајног (један и два дана) утицаја *JA*. Код третмана који је трајао 14 дана статистички значајно се повећао број листова при концентрацијама од 25, 50 и 100 μM *JA*, са максималним просечним бројем листова (7,38) на највишој наведеној концентрацији. Даље повећање концентрације није доводило до промене броја листова у односу на контролну групу (Слика 29 А).

Биљке које су се опорављале од дводневног претретмана *JA* у опсегу концентрација од 25 – 100 μM имале су већи број листова у односу на контролну групу. Претходно гајење при концентрацији од 200 μM *JA* и у трајању од 14 дана доводило је до пропадања формираних листова, па је због тога њихов коначни број био статистички значајно мањи у односу на контролне биљке (Слика 29 Б).

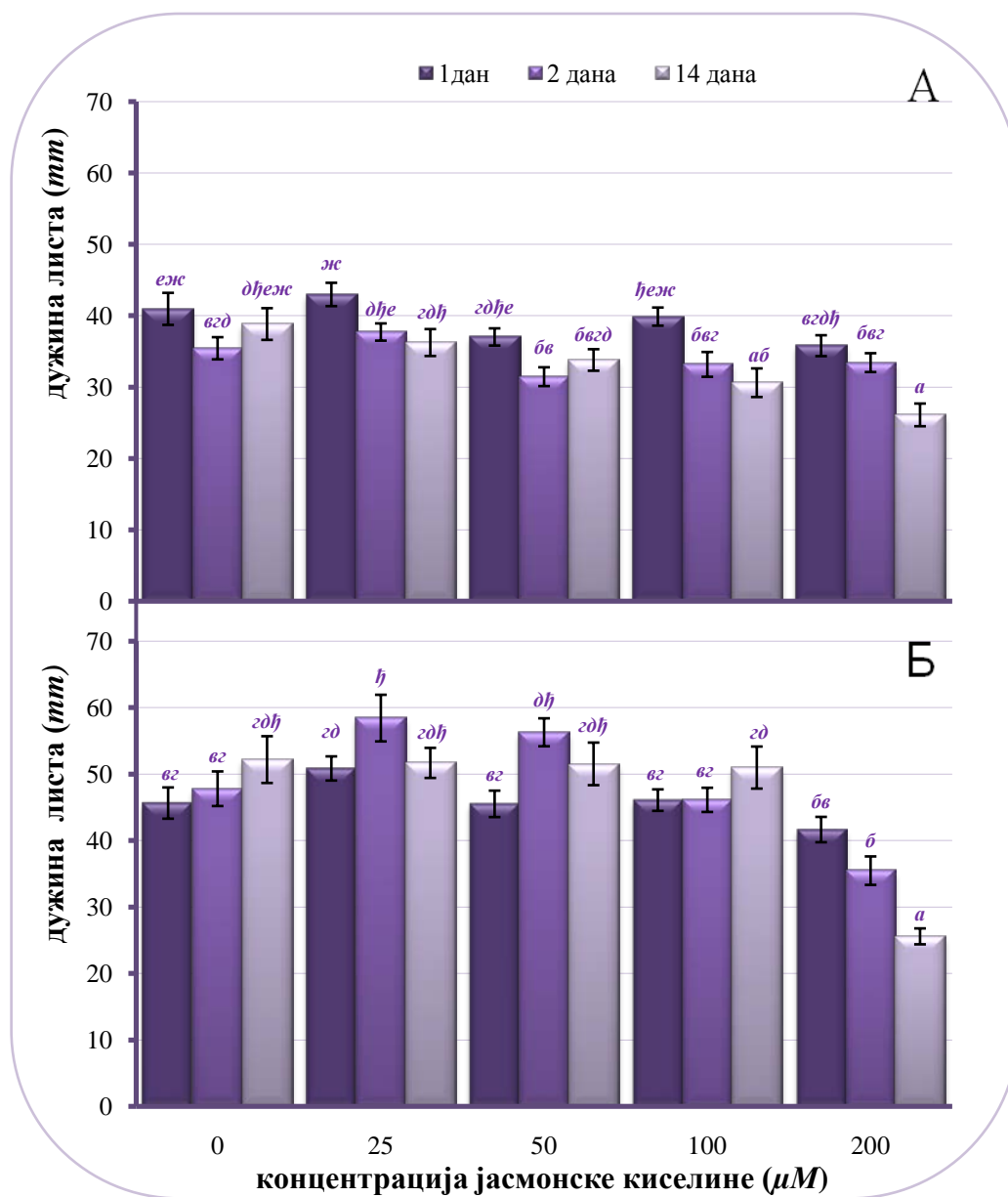
Ефекта *JA* на издуживање стабла није било.



Слика 29 Број листова у розети након третмана јасмонском киселином у трајању од 1 до 14 дана (А) и након опоравка на МС подлози са 0,1 М сахарозом без хормона у трајању од 14 дана (Б). Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

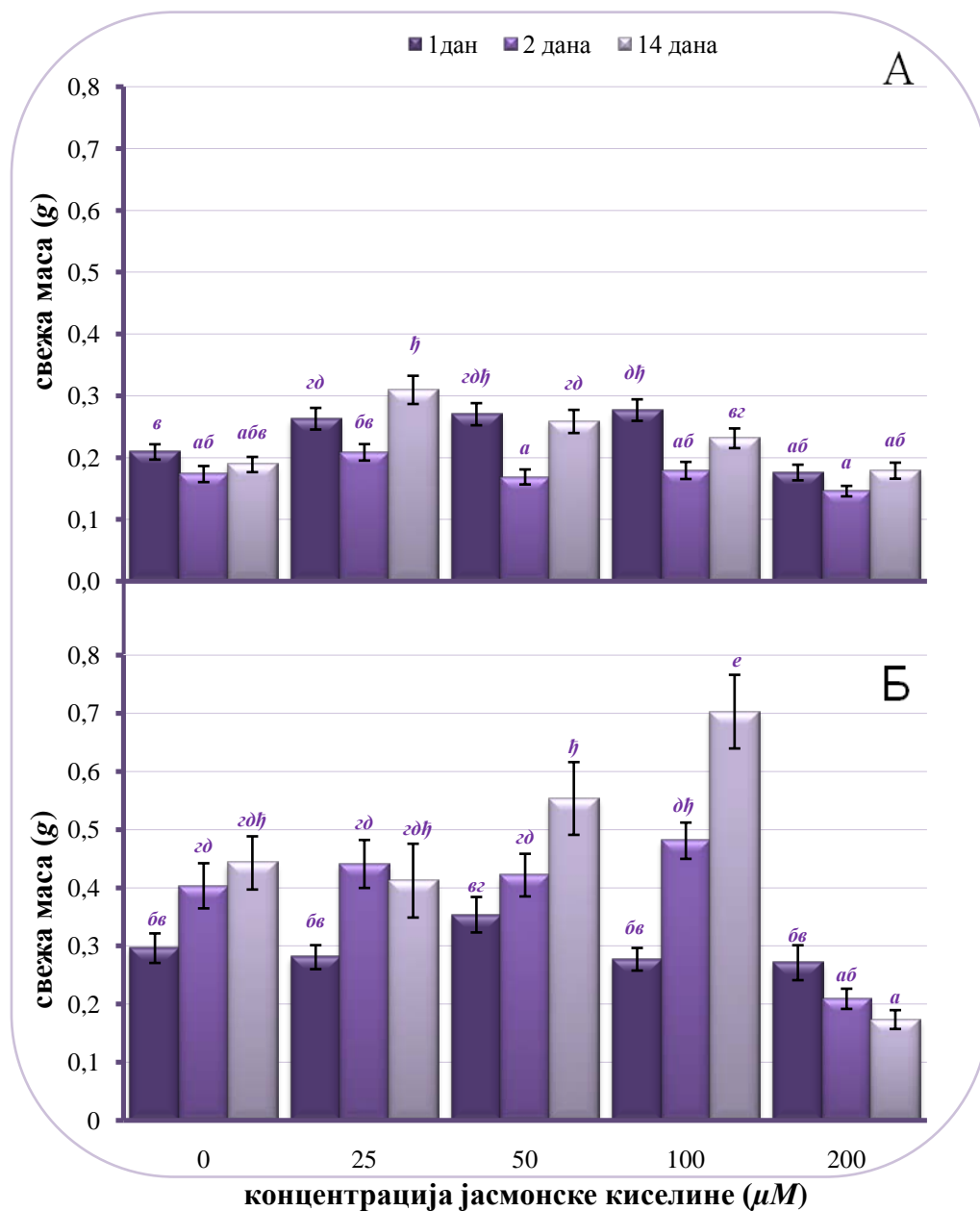
Са повећањем концентрације ЈА и са продужавањем времена дејства од једног до 14 дана опадала је дужина листова у односу на контролне биљке све до вредности од 26,08 mm на третману од 14 дана, при концентрацији од 200 μM ЈА (Слика 30 А).

Дужина листова биљака након опоравка од дводневног претретмана са 25 и 50 μM *JA* била је статистички значајно већа у односу на контролну групу. Инхибиторно дејство највише концентрације *JA* није било превазиђено након опоравка (Слика 30 Б).



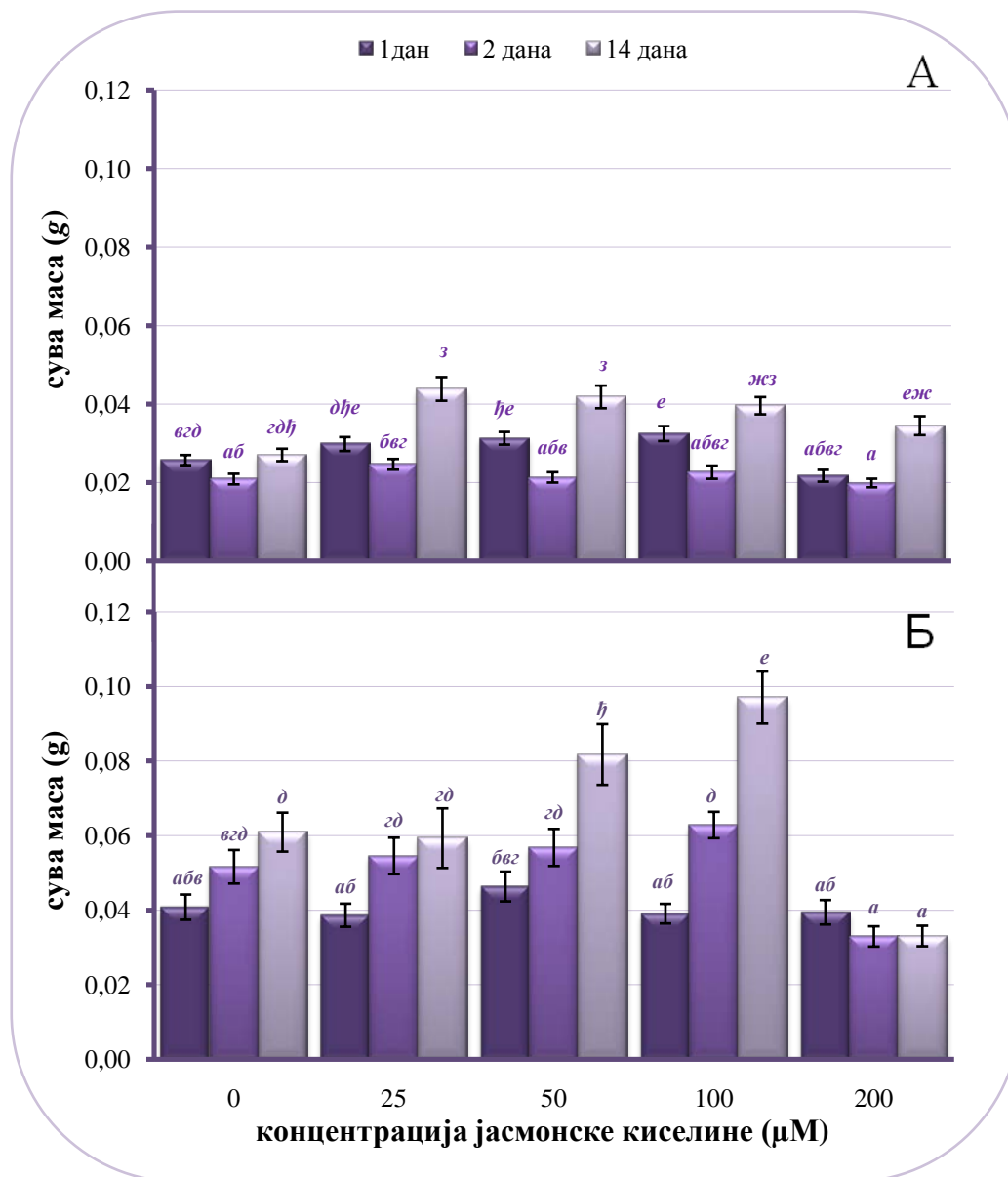
Слика 30 Дужина најдужег листа биљака након третмана јасмонском киселином у трајању од 1 до 14 дана (А) и након опоравка на МС подлози са 0,1 М сахарозом без хормона у трајању од 14 дана (Б). Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

Највећу свежу, односно суву масу (0,31 g односно 0,04 g) у односу на контролне имале су биљке гајене на подлози са 25 μM JA у трајању од 14 дана (Слика 31 А и 32 А)



Слика 31. Свежа маса биљака након третмана јасмонском киселином у трајању од 1 до 14 дана (А) и након опоравка на МС подлози са 0,1 M сахарозом без хормона у трајању од 14 дана (Б). Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

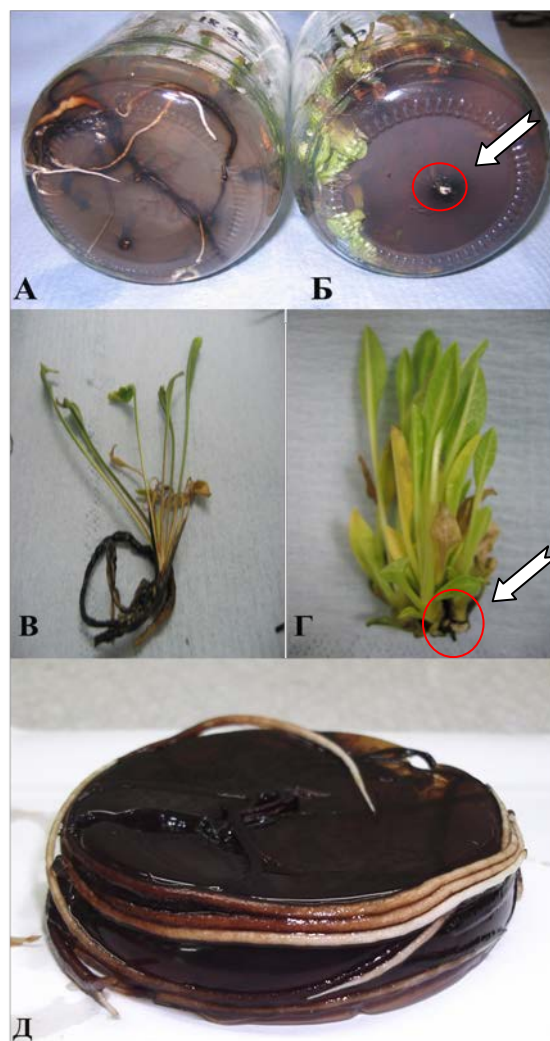
Стимулаторни претретман *JA* на продукцију биомасе је био видљив код биљака на опоравку које су претходно гајене 14 дана на 50 и 100 μM *JA*. Свежа маса ових биљака износила је 0,55 односно 0,70 g (Слика 31 Б). Инхибиторни ефекат индукован концентрацијом од 200 μM *JA* уочен је тек након опоравка. Промена суве масе пратила је промену свежине масе биљака (Слика 32 Б).



Слика 32 Сува маса биљака након третмана јасмонском киселином у трајању од 1 до 14 дана (А) и након опоравка на МС подлози са 0,1 M сахарозом без хормона у трајању од 14 дана (Б). Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

4.2. Ожиљавање изданака

Без обзира на дужину гајења, биљке које су расле на подлози за мултипликацију никада нису давале коренове, а на месту контакта са подлогом појављивао се само растресити калус (Слика 33 Б и Г). Када су расле на подлогама које нису садржале цитокидине и ауксине биљке су формирале коренске примордије након три недеље.

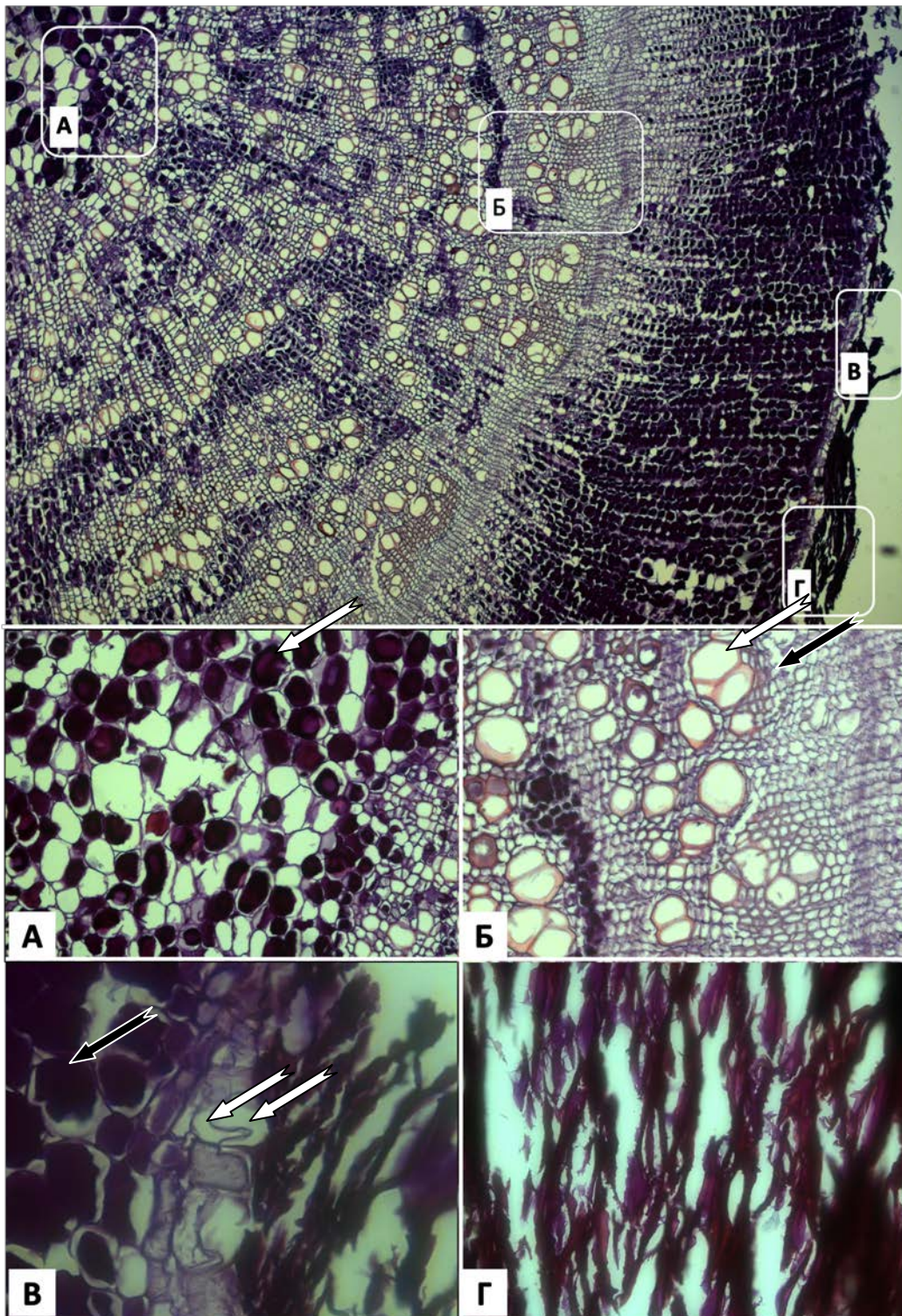


Слика 33 Биљке *R. umbellata* након 7 недеља гајења *in vitro* (А, В- биљке на МС подлози са 30 g l^{-1} сахарозе; Б, Г – биљке на подлози за мултипликацију (стрелице означавају појаву калуса), Д – МС подлога са 30 g l^{-1} сахарозе након 95 дана са добро развијеним кореновима.

Код биљака из природе осовински корен је споља црне боје и прекривен мртвом кором која се састоји из слоја који се љуспасто скида и компактног, чврстог слоја који лако пуца и одваја се (Слика 34 А-Е). Код биљака из *in vitro* културе мртва кора је компактна и подсећа на сунђерасту масу (Слика 35 Г и 36). Хистолошка анализа показала је да коренови биљака *R. umbellata* гајених *in vitro* имају типичну секундарну грађу (Слика 35 А- Г).



Слика 34 Биљка *R. umbellata* из природе (А – изглед целе биљке; Б – корен са напрслим омотачем; В – средишњи део корена са омотачем; Г – корен; Ђ - омотач корена „рукав”; Е – кора корена.

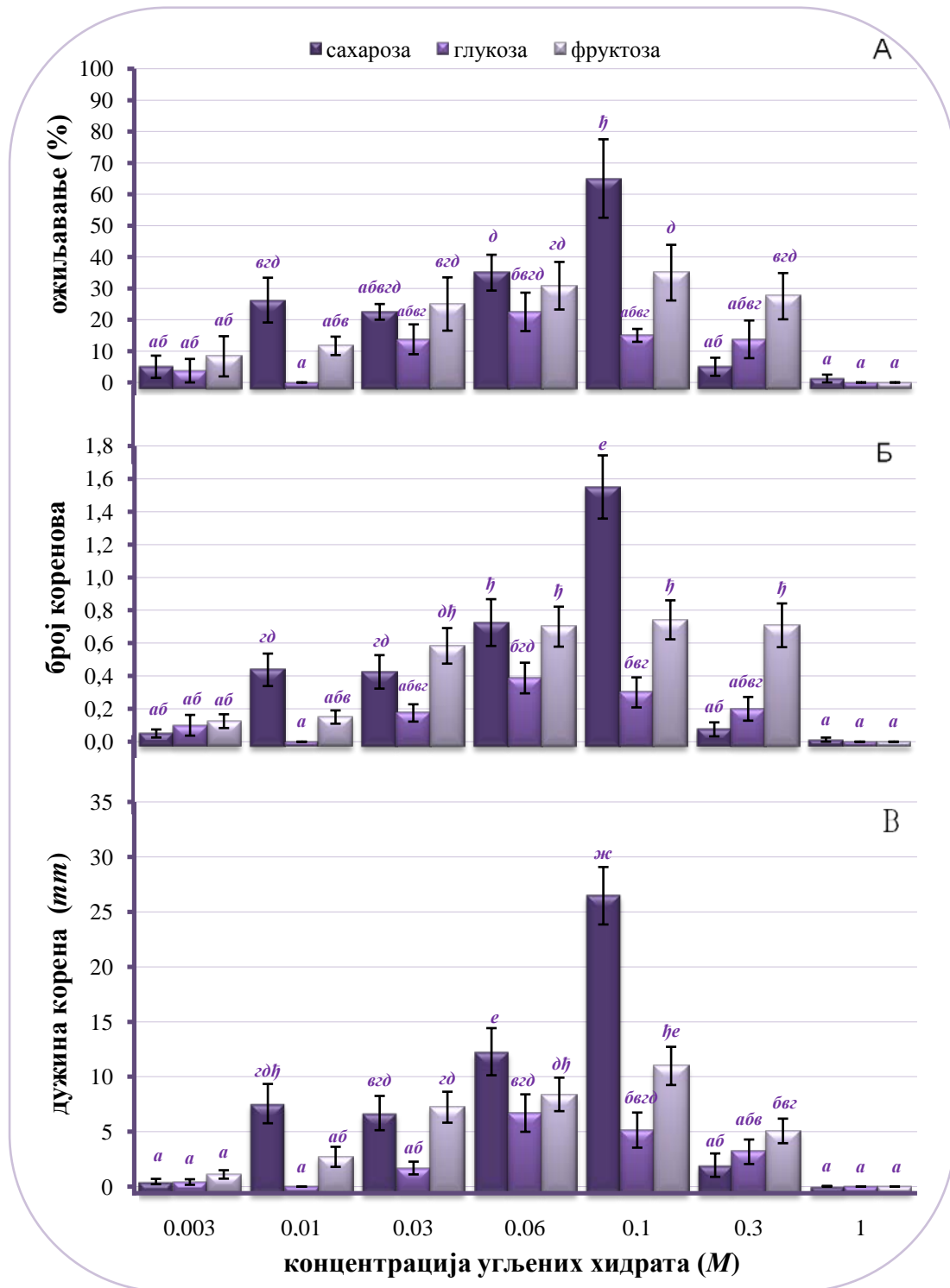


Слика 35 Попречни пресек корена *R. umbellata in vitro* након 6 недеља гајења (А – централни цилиндар са означеним обојеним садржајем; Б – проводни снопићи (бела ↑ - ксилем, а црна ↑ - флоем); В – ћелије коре (бела ↑) и обојени садржај ћелија секундарног паренхима (црна ↑); Г – ћелије мртве коре).



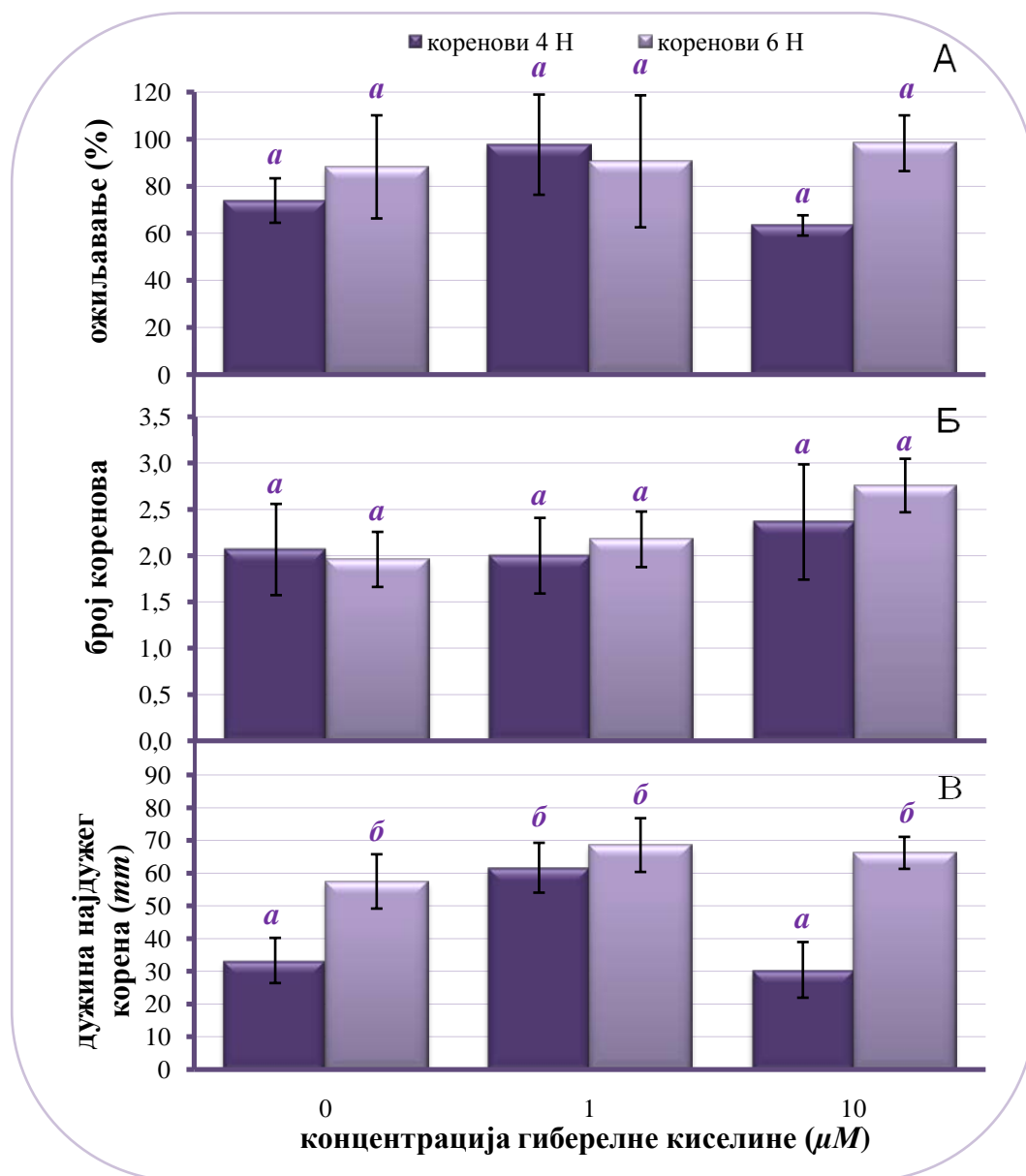
Слика 36 Корен *R. umbellata in vitro* након 6 недеља гајења (↑- омотач корена).

Најефикасније ожиљавање од 65% уочено је на подлози која је садржала 0,1 М сахарозе, док су подлоге са глукозом и фруктозом биле мање ефикасне (Слика 37 А). Највећи број коренова по експлантату (1,55) формирао се на подлози са 0,1 М сахарозом. При истој концентрацији глукозе је образовано 5,17 пута мање коренова тј. 0,3 по експлантату. На подлози са фруктозом, у опсегу концентрација од 0,03 - 0,3 М, образовано је од 0,58 до 0,74 корена по експлантату. Максимална дужина најдужег корена од 26,48 mm забележена је на подлози са 0,1 М сахарозом. При истој концентрацији фруктозе, односно глукозе, коренови су били знатно краћи (10,99 mm, односно 5,15 mm). Висок садржај (1 М) свих примењених шећера инхибирао је формирање коренова (Слика 37 А, Б и В).



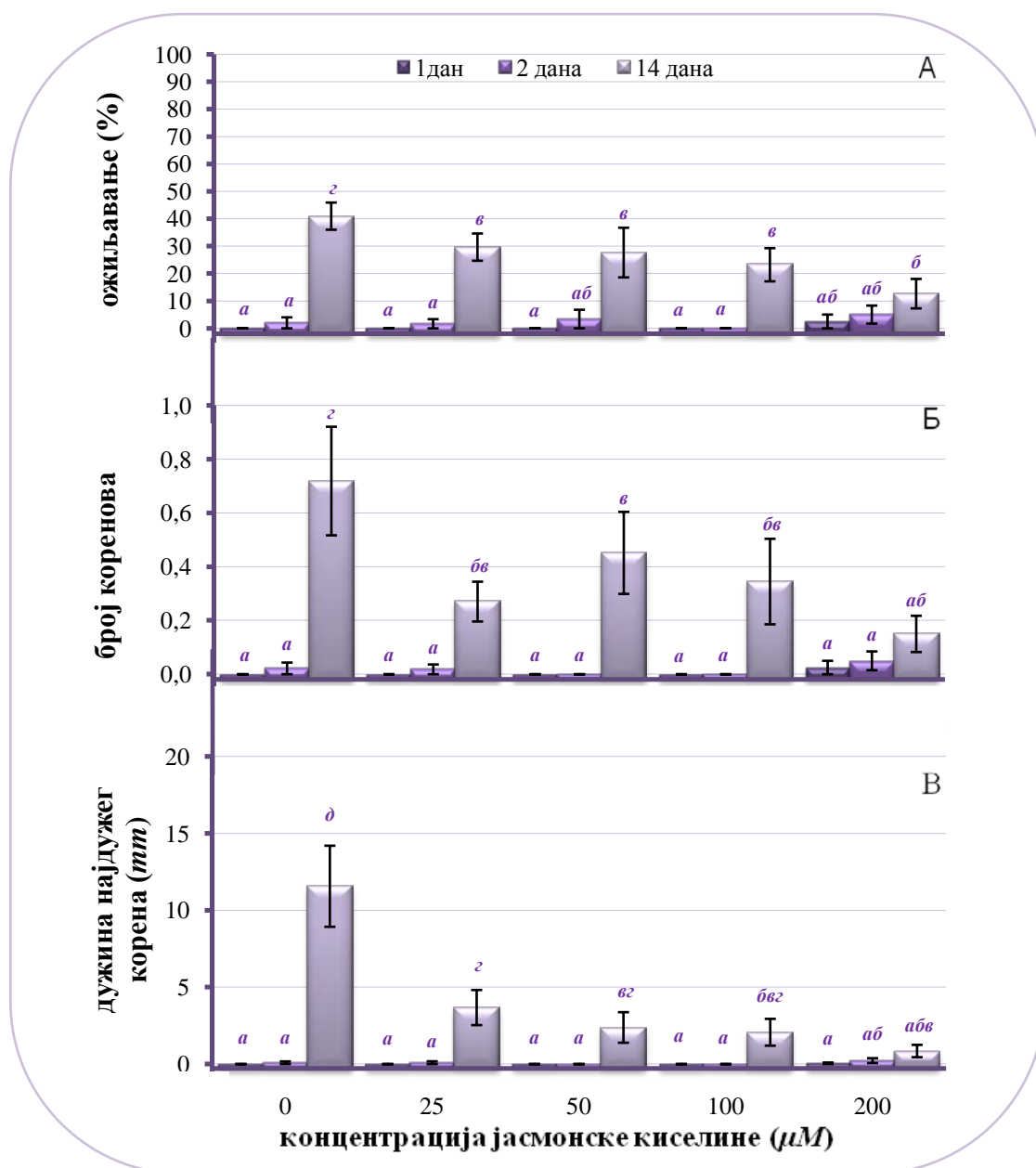
Слика 37 Процент оживљавања (А), број коренова по оживљеном експлантату (Б) и дужина најдужег корена (В) након четири недеље растења на хранљивој подлози са сахарозом, глукозом и фруктозом. Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

Гајење биљака током 4 и 6 недеља на растућим концентрацијама GA_3 статистички значајно не повећава проценат ожиљавања ни број коренова по ожиљеном експлантату у односу на контролну групу (Слика 38 А и Б), али после 4 недеље повећава се дужина коренова, која је максимална под утицајем $1 \mu M GA_3$ и износи $61,67 \text{ mm}$ (Слика 38 В). Овај краткотрајни ефекат $1 \mu M GA_3$ на почетно издуживање коренова није уочен код старијих биљака (Слика 38 В).



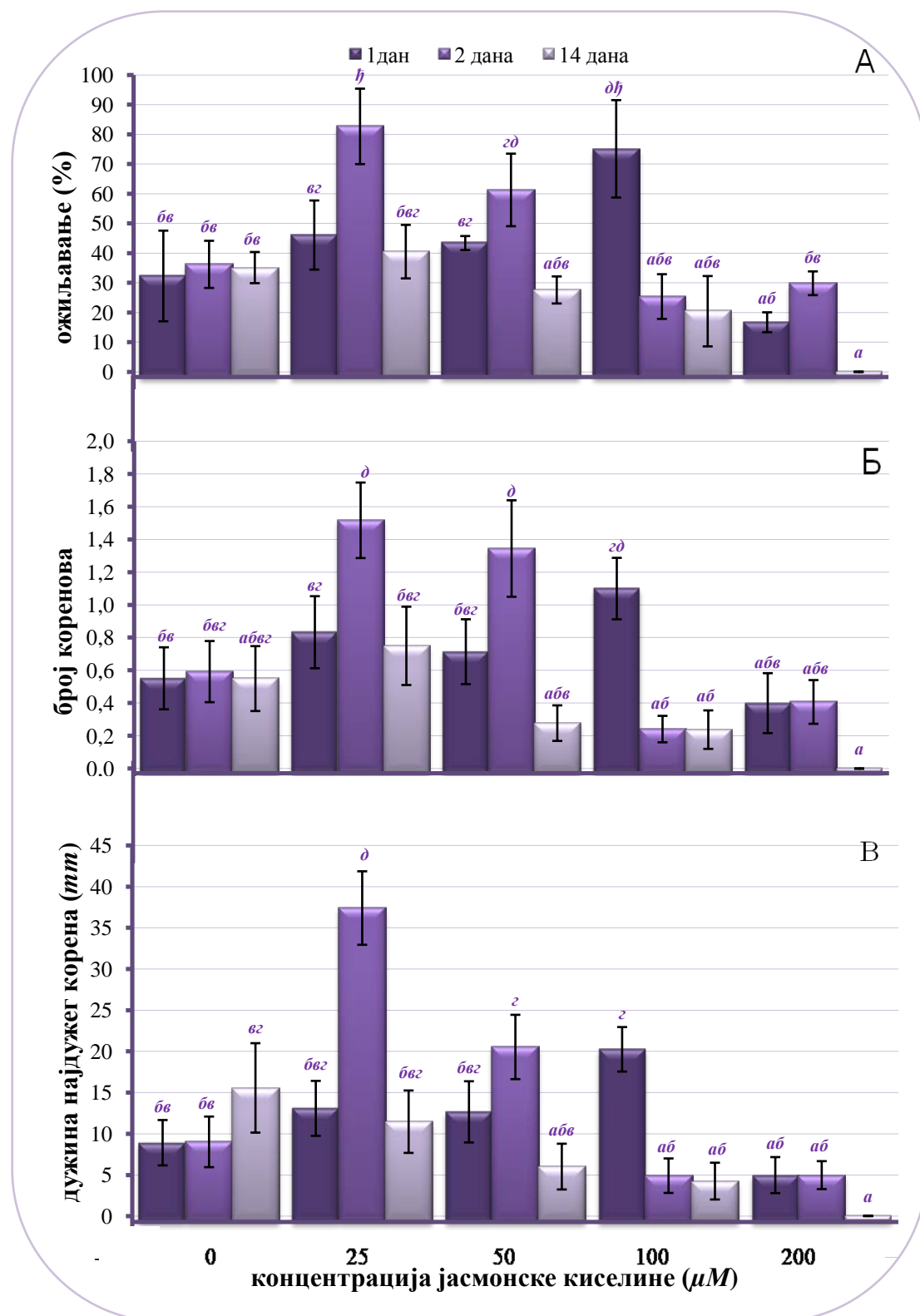
Слика 38 Процент ожиљавања (А), број коренова по ожиљеном експлантату (Б) и дужина најдужег корена (В) након четири (4 Н) и шест недеља (6 Н) растења на хранљивој подлози са различитим концентрацијама GA_3 . Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

Биљке гајене на растућим концентрацијама ЈА после једног дана нису имале новоформиране коренове ни у контролној групи. Након два дана појавили су се први коренови (Слика 39 А). Коренови контролних биљака су били потпуно развијени после 14 дана док се на третманима са ЈА уочавао смањени проценат ожиљавања, број коренова као и њихова дужина (Слика 39 А, Б и В).



Слика 39 Процент ожиљавања (А), број коренова по ожиљеном експлантату (Б) и дужина најдужег корена (В) након третмана јасмонском киселином у трајању од 1 до 14 дана. Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

Стимулаторно дејство *JA* уочено је тек након опоравка биљака од краткотрајних претретмана овим регулатором растења. Једнодневни претретман *JA* од $100 \mu M$ доводио је до повећања процента ожиљавања, броја коренова и дужине најдужег корена (Слика 40 А, Б и В). Биљке на опоравку које су биле на дводневном претретману имале су максималне параметре ожиљавања на нешто нижим концентрацијама *JA*, од 25 и $50 \mu M$, на којима је забележена појава од $87,72\%$, односно $61,30\%$ коренова, дужине од $37,38 \text{ mm}$, односно $20,51 \text{ mm}$ и са $1,52$, односно $1,34$ корена по експлантату. Више концентрације *JA* и дужа претходна изложеност биљака инхибирале су образовање коренова. Након опоравка од претретмана са $200 \mu M$ *JA* који је трајао 14 дана није било формираних коренова (Слика 40 А, Б и В).



Слика 40 Процент ожиљавања (А), број коренова по ожиљеном експлантату (Б) и дужина најдужег корена (В) након опоравка на МС подлози са 0,1 М сахарозом без хормона у трајању од 14 дана. Резултати представљају средњу вредност из независних експеримената $n = 40 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

4.3. Аклиматизација биљака

За аклиматизацију на услове стакларе коришћени су ожиљени експлантати стари четири недеље. Ожиљавање је вршено на МС подлози са 30 g l^{-1} сахарозе без хормона. Након два месеца гајења у стаклари 71,43% ожиљених експлантата се аклиматизовало на нестерилне услове и раст у земљи. Биљке старе два месеца су затим пресађене на отворену парцелу. Успешно је аклиматизовано 57,14% пренетих биљака из стакларе. Укупна ефикасност аклиматизације од тренутка преношења из *in vitro* услова до првог пролећа у спољашњим условима, била је 34,29%. Прву зиму је преживело 42,86% пресађених биљака, а другу 88,89% преосталих. Након прве зиме цветало је 44,44%, а након друге 25,00% биљака (Слика 41 А - Г). Семена сакупљена током три године гајења чувају се у банци семена Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ ради даљих истраживања.

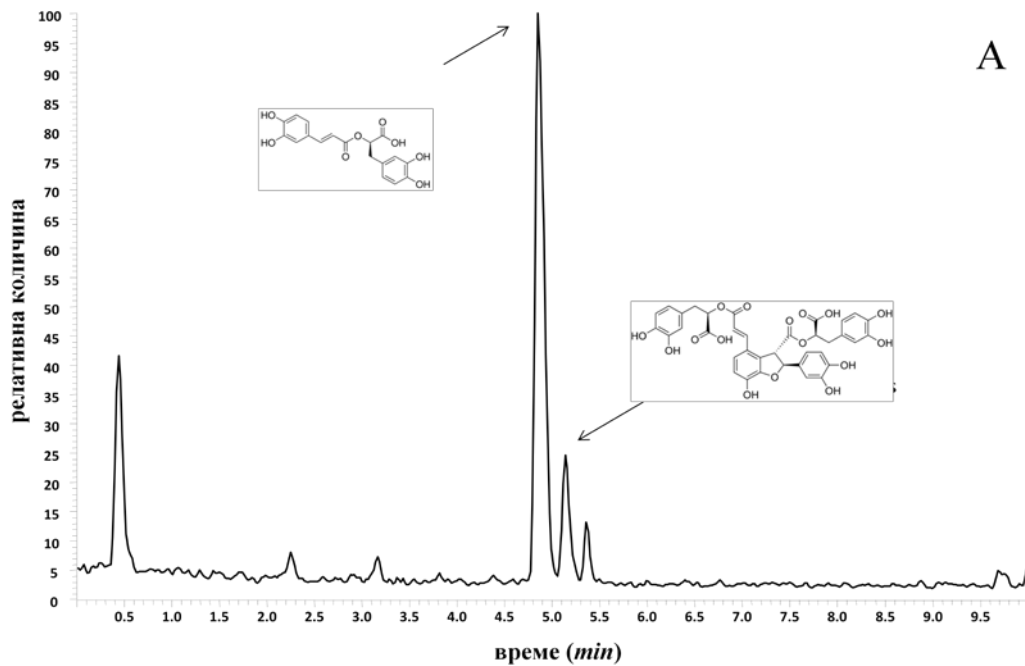


Слика 41 Аклиматизација биљака А – биљке у стаклари; Б – биљке у пољу; В - затворени цветови (младе цвасти); Г - процветале биљке.

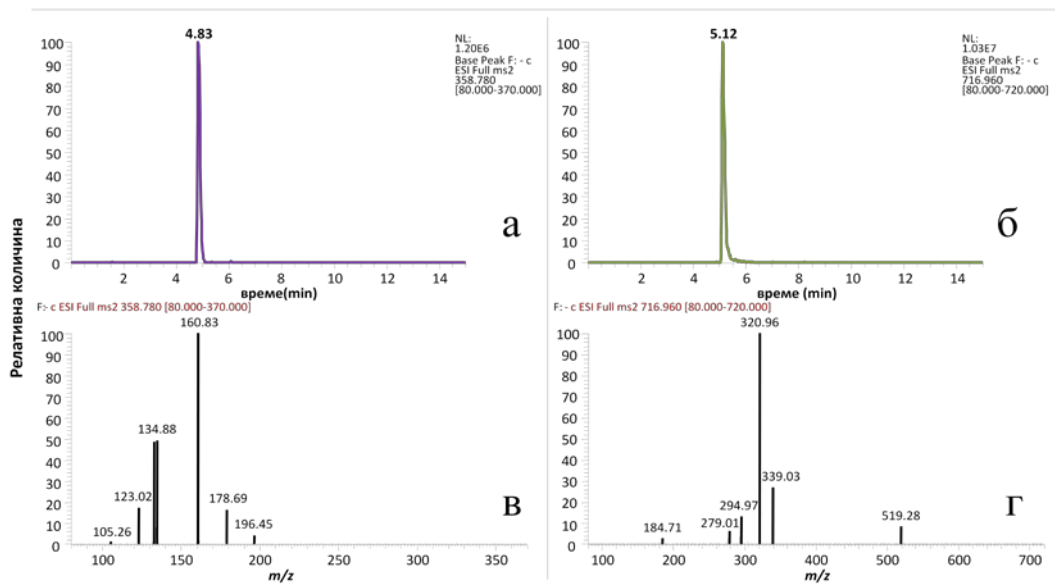
4.4. Продукција секундарних метаболита

Познато је да биљке из фамилије **Boraginaceae** садрже разноврсне секундарне метаболите који се могу синтетисати у различитим органима током појединих фаза растења и развића. Зато је прво анализирана површина листа у циљу утврђивања присуства жлезданих длака. Утврђено је потпуно одсуство жлезданих и присуство само механичких длака. У тренутку узорковања биљке из природе су биле потпуно развијене па су одвојени узорци отворених и затворених цветова, стабла, листова из розете, корена, омотача и коре корена (Слика 34 А, Г, Ђ, Е). Биљке *in vitro* су биле млађе и код њих су одвајани само узорци изданака и коренова (Слика 33 В). У датим узорцима одређен је квалитативан садржај пиролизидинских алкалоида и фенолних једињења. Спектрофотометријски су утврђени квантитативни подаци за укупне феноле. Помоћу *HPLC-DAD* и *UHPLC/DAD/+HESI-MS/MS* анализа квалитативно и квантитативно су одређене рузмаринска киселина и литоспермична киселина Б у метанолним екстрактима (Слика 42).

Биљке гајене *in vitro* након појаве првих коренова ослобађају супстанце које боје подлогу у сиво, до тамно црвено, а након дужег времена у црно (Слика 33 А, Д). Анализом подлоге утврђено је да она садржи мале количине фенолних једињења, флавоноида и рузмаринске киселине (подаци нису приказани). Због црвене боје метанолног раствора подлоге *HPLC - MS/MS* методом је тестирано више узорака, али није установљена природа и тачан састав црвеног пигмента.



Б



Слика 42 UHPLC/-HESI-MS/MS анализа метанолног екстракта *R. umbellata*. А) UHPLC/-HESI-MS хроматограм укупних јона у опсегу m/z од 100 до 1000, са доминантним пиковима који одговарају рузмаринској киселини (R_t 4,83 минута) и литоспермичној киселини Б (R_t 5,12 минута). Б) PIS (енг. *product ion scanning*) експерименти за масу m/z 359, која одговара молекуларном јону $[M-H]^-$ рузмаринске киселине (а) и за масу m/z 717, која одговара молекуларном јону $[M-H]^-$ литоспермичне киселине Б (б). UHPLC/-HESI-MS/MS масени спектри продукт - јона рузмаринске киселине (в) и литоспермичне киселине Б.

4.4.1 Анализа садржаја пиरोлизидинских алкалоида

Применом техника *GC-MS* добијени су подаци о садржају пиролизидинских алкалоида. Засићени и незасићени пиролизидински алкалоиди (укупно 19) највише су заступљени у надземном делу биљака из природе и веома су разноврсни (Табела 17). У отвореним цветовима присутно је пет врста засићених (*PAS*) и три врсте незасићених (*PANS*) пиролизидинских алкалоида, од којих су линделофин и *PANS II* присутни и у кореновима.

Да би достигли праг детекције апарата узорци биљака гајених *in vitro* морали су да се упаре, тако да су били 15 пута концентрованији у односу на узорке биљака из природе. Пронађена су само три засићена пиролизидинска алкалоида, од којих је у изданцима присутан 7-ангелоилхелиотридан, а у кореновима линделофин и *PAS V* (Табела 17). Због мале заступљености алкалоида у узорцима *in vitro* нису вршена даља испитивања промене садржаја пиролизидинских алкалоида код биљака гајених на различитим третманима.

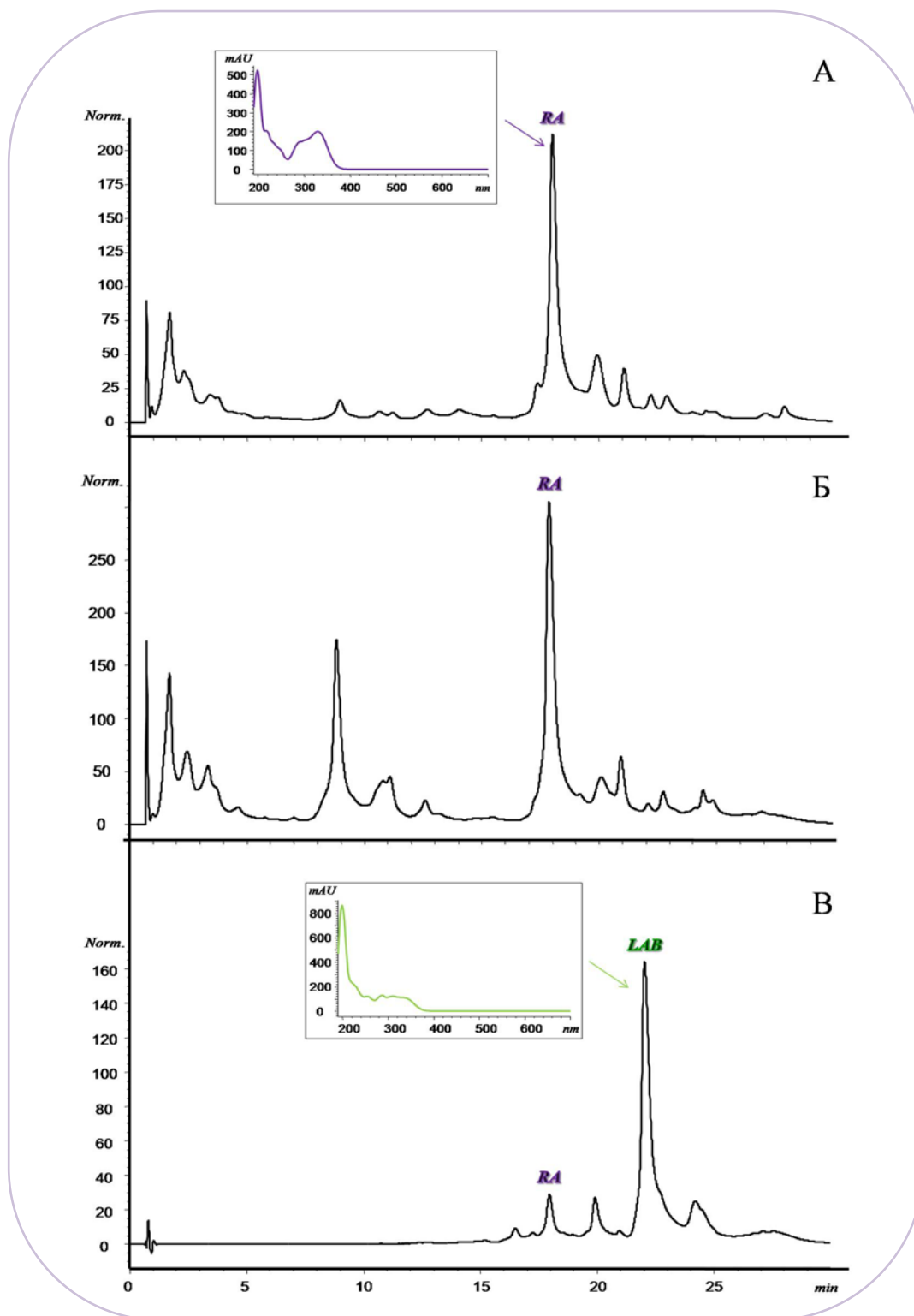
Табела 17 Заступљеност пиролизидинских алкалоида у узорцима биљака из природе и биљака гајених *in vitro* 6 недеља на МС подлози са 0,1 М сахарозом. *PAS* - засићени пиролизидински алкалоид непознате структуре; *PANS* - незасићени пиролизидински алкалоид непознате структуре; Тамно зелено - засићени пиролизидински алкалоиди; Светло зелено - незасићени пиролизидински алкалоиди.

Пиролизидински алкалоиди	Ретенционо време (минута)	природа			<i>in vitro</i>	
		отворени цветови	листови розете	коренови	изданци	коренови
7-Ангелоилхелиотридан	12.349	+	+		+	
<i>PANS I</i>	13.055		+			
7-Ангелоилхелиотридин	13.171	+	+			
<i>PAS I</i>	14.232		+			
<i>PAS II</i>	14.331		+			
<i>PAS III</i>	14.873		+			
<i>PAS IV</i>	15.001		+			
Линделофин	15.176	+	+	+		+
<i>PAS V</i>	15.369		+			+
<i>PAS VI</i>	15.485		+			
<i>PANS II</i>	16.878	+	+	+		
<i>PANS III</i>	16.919		+	+		
<i>PANS IV</i>	17.205		+			
<i>PAS VII</i>	18.376	+	+			
<i>PAS VIII</i>	18.487		+			
<i>PAS IX</i>	18.663	+	+			
7-Ангелоил- 9-(+)-трахелантилхелиотридин	19.571	+	+			
Пунктанецин	19.746	+	+			
Хелиосупин	20.288		+			

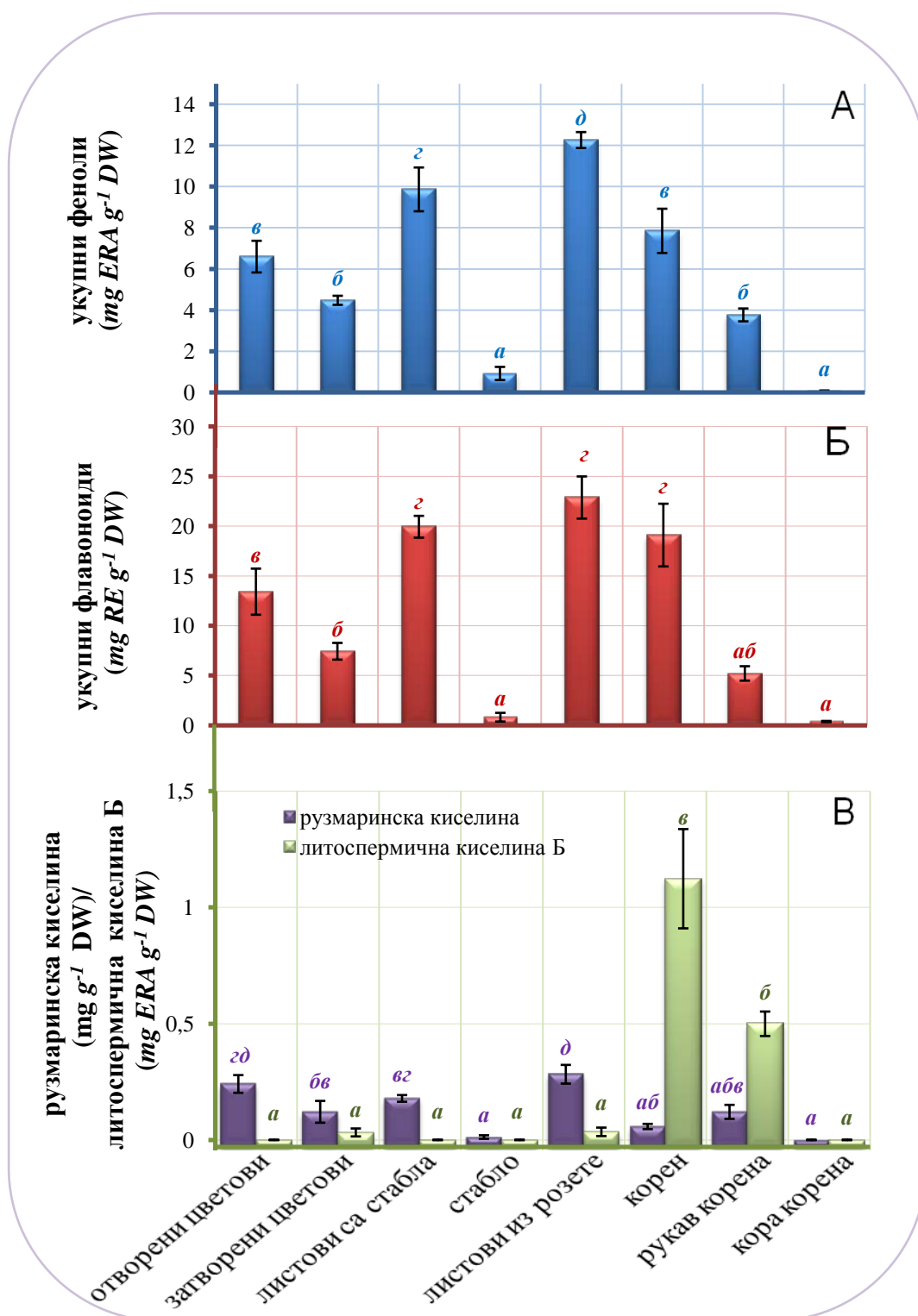
4.4.2 Анализа садржаја фенолних једињења

У биљкама из природе убраних у пролеће, у фази цветања, варијала је количина фенолних једињења у различитим органима (Слике 43 А, Б, В и 44 А, Б, В). Највише укупних фенола $12,27 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$ детектовано је у листовима из розете, од којих је 2,3% била чиста *RA* ($0,28 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) и 0,3% чисте *LAB*. Коренови су садржали укупне феноле у количини од $7,85 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$ и у односу на друге делове биљке у њима је био највиши удео *LAB* 14,3% ($1,12 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$). У целом надземном делу измерено је 24 пута мање *LAB* по граму суве масе у односу на корен са рукавом корена. Фенолна једињења у стаблу и кори корена јављала су се у траговима (Слика 44).

Значајан је био удео флавоноида у укупним фенолним једињењима. Њихов садржај се мењао сразмерно количини укупних фенола. Највише флавоноида детектовано је у листовима из розете $22,87 \text{ mg RE g}^{-1} \text{ DW}$ (Слика 44 Б).



Слика 43 HPLC хроматограм метанолног екстракта биљака *R. umbellata* из природе А) цвет; В) лист; С) корен. Пикови и спектри најзаступљенијих фенолних компоненти су посебно означени. *RA* – рузмаринска киселина; *LAB* – литоспермична киселина Б.



Слика 44. Садржај укупних фенола (А), флавоноида (Б), рузмаринске и литоспермичне Б киселине (В) у биљкама из природе убраним у пролеће, у време цветања. Резултати А и Б представљају средњу вредност 3 биолошка узорка мерена у по 3 техничка понављања $n = 9 \pm SE$. Резултати В представљају средњу вредност мерења 3 биолошка узорка $\pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

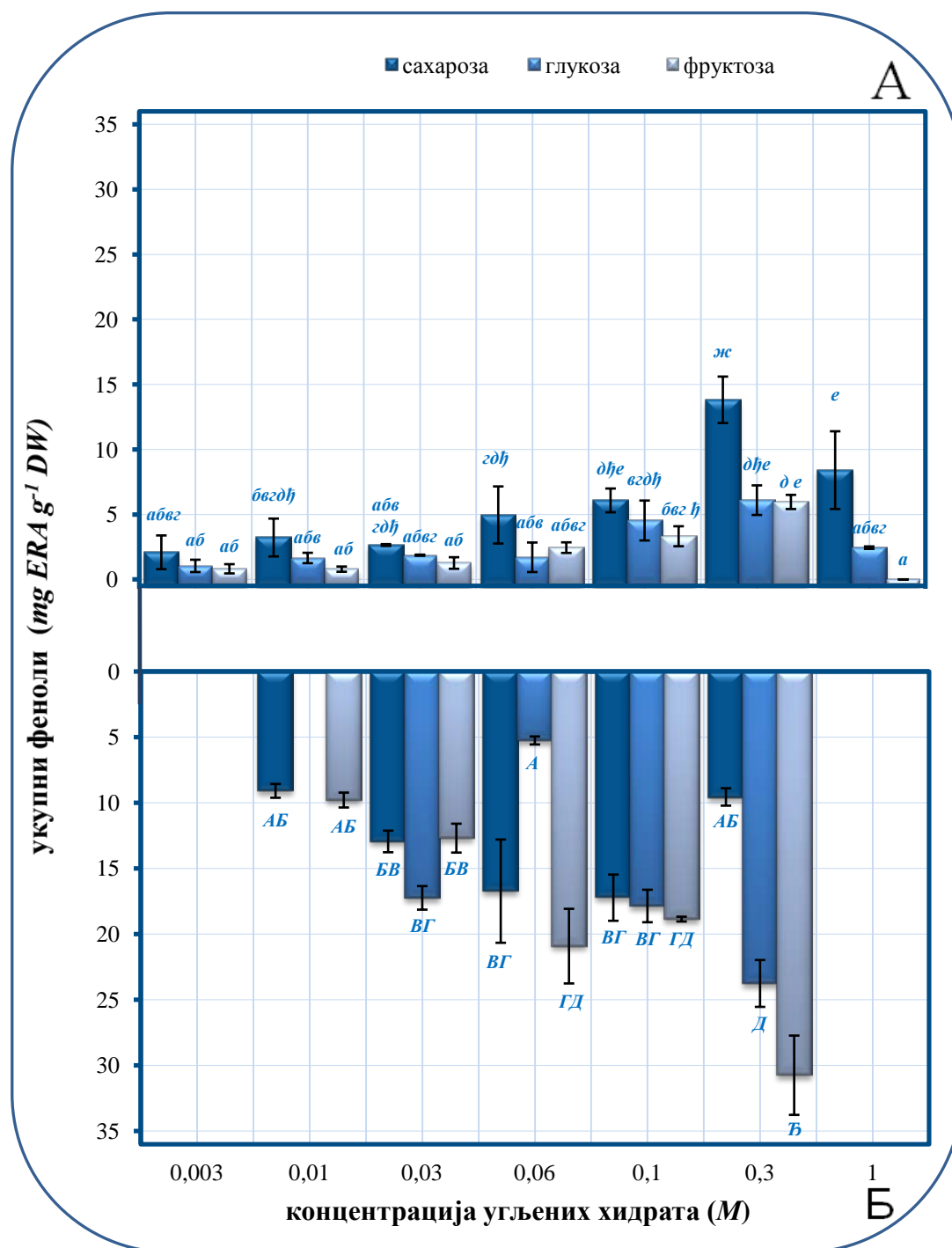
4.4.2.1. Утицај различитих угљених хидрата на продукцију фенолних једињења *in vitro*

У експерименту у коме је испитиван утицај различитих концентрација три врсте угљених хидрата на продукцију секундарних метаболита након 4 недеље гајења утврђено је да са повећањем концентрације шећера у подлози расте и продукција укупних фенола у изданцима, до концентрације шећера од 0,3 М (Слика 45 А). На овој концентрацији у изданцима биљака гајених на подлогама са сахарозом забележена је највећа количина укупних фенола ($13,82 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$; удео *RA* био је 11,9%), док је најнижи садржај детектован у биљакама гајеним на подлогама са фруктозом ($5,96 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$). Удео рузмаринске киселине у укупним фенолима при концентрацији хексоза од 0,3 М био је 9,5%. Висок ниво продукције укупних фенола се задржао при концентрацији од 1 М сахарозе ($8,41 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$), док је нагли пад продукције забележен на 1 М глукози ($2,44 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$). Садржај укупних фенола на третману са 1 М фруктозом био је испод прага детекције (Слика 45 А).

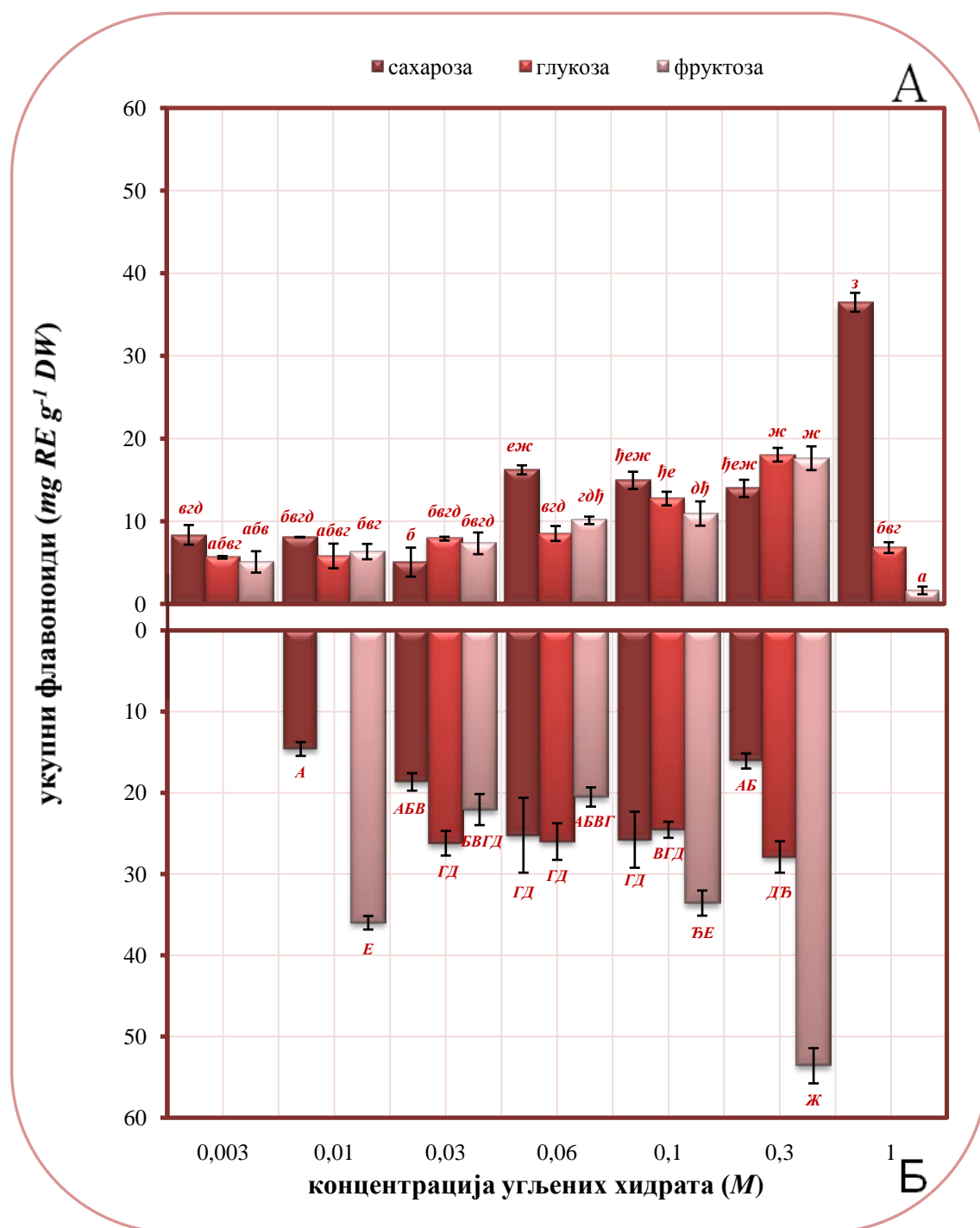
Највиша продукција флавоноида износила је $36,48 \text{ mg RE g}^{-1} \text{ DW}$ у изданцима биљака које су расле на подлогама са сахарозом концентрације 1 М. Оптимална концентрација хексоза за продукцију флавоноида била је 0,3 М (Слика 46 А).

Највиша вредност *RA* ($2,64 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) измерена је у изданцима биљака гајених на подлози са сахарозом концентрације 1 М (удео у укупним фенолима био је 31,24%), док је код хексоза максимална продукција *RA* била при концентрацији од 0,3 М (Слика 47 А)

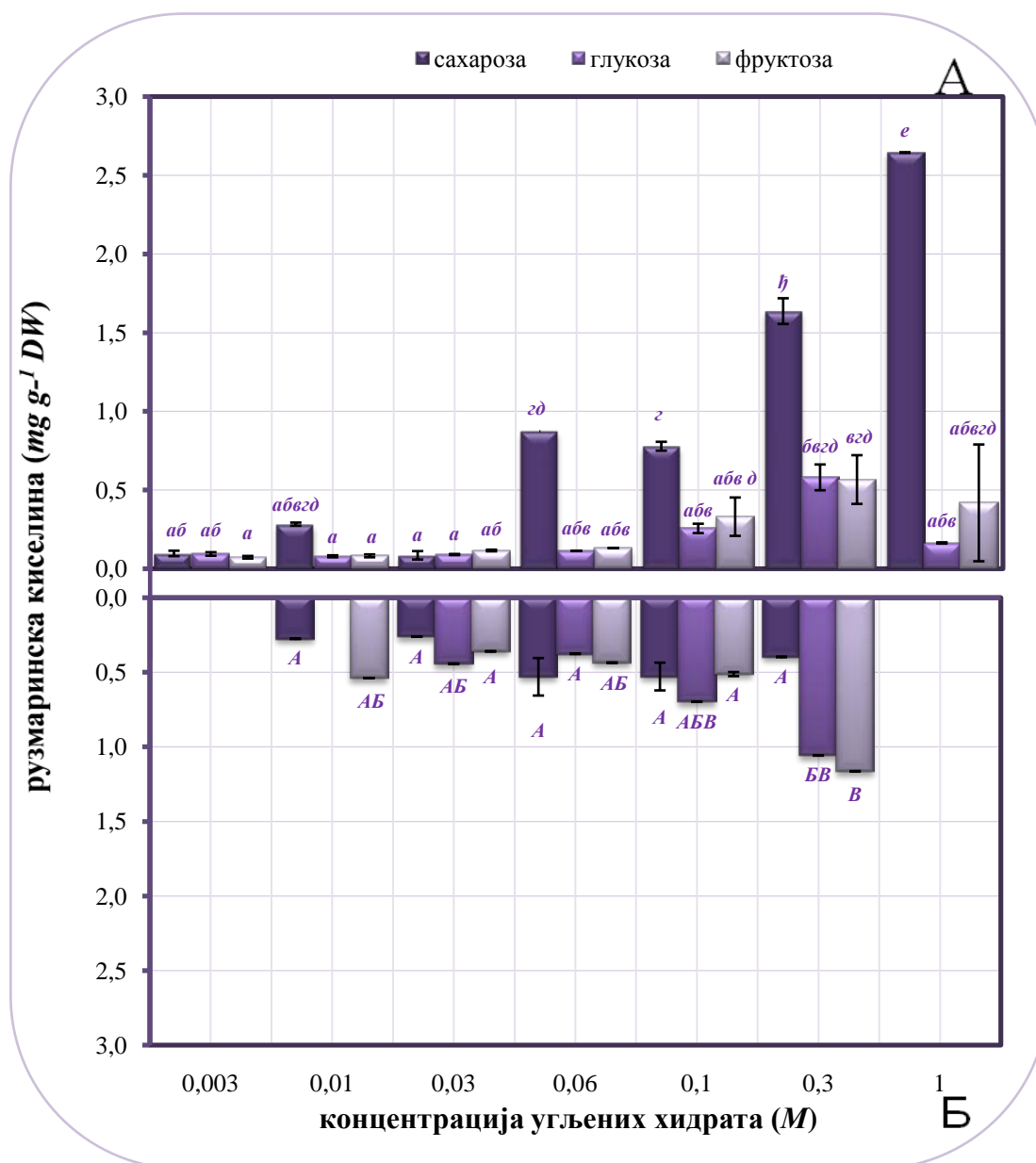
Коренови су генерално продуковали више укупних фенола у односу на изданке, сразмерно примењеној концентрацији шећера до 0,3 М (Слика 45, 46 и 47). Једино је при концентрацији сахарозе од 0,3 М садржај *RA* у кореновима био 4,1 пута мањи од садржаја у надземном делу (Слика 47 А и Б).



Слика 45 Садржај укупних фенола у изданцима (А) и кореновима (Б) биљака након четири недеље растења на хранљивој подлози са сахарозом, фруктозом и глукозом. Приказане вредности садржаја фенолних једињења у изданцима представљају средњу вредност 3 биолошка узорка мерена у по 3 техничка понављања $n = 9 \pm SE$, а у кореновима средњу вредност 2 биолошка узорка мерена у по 3 техничка понављања $n = 6 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).



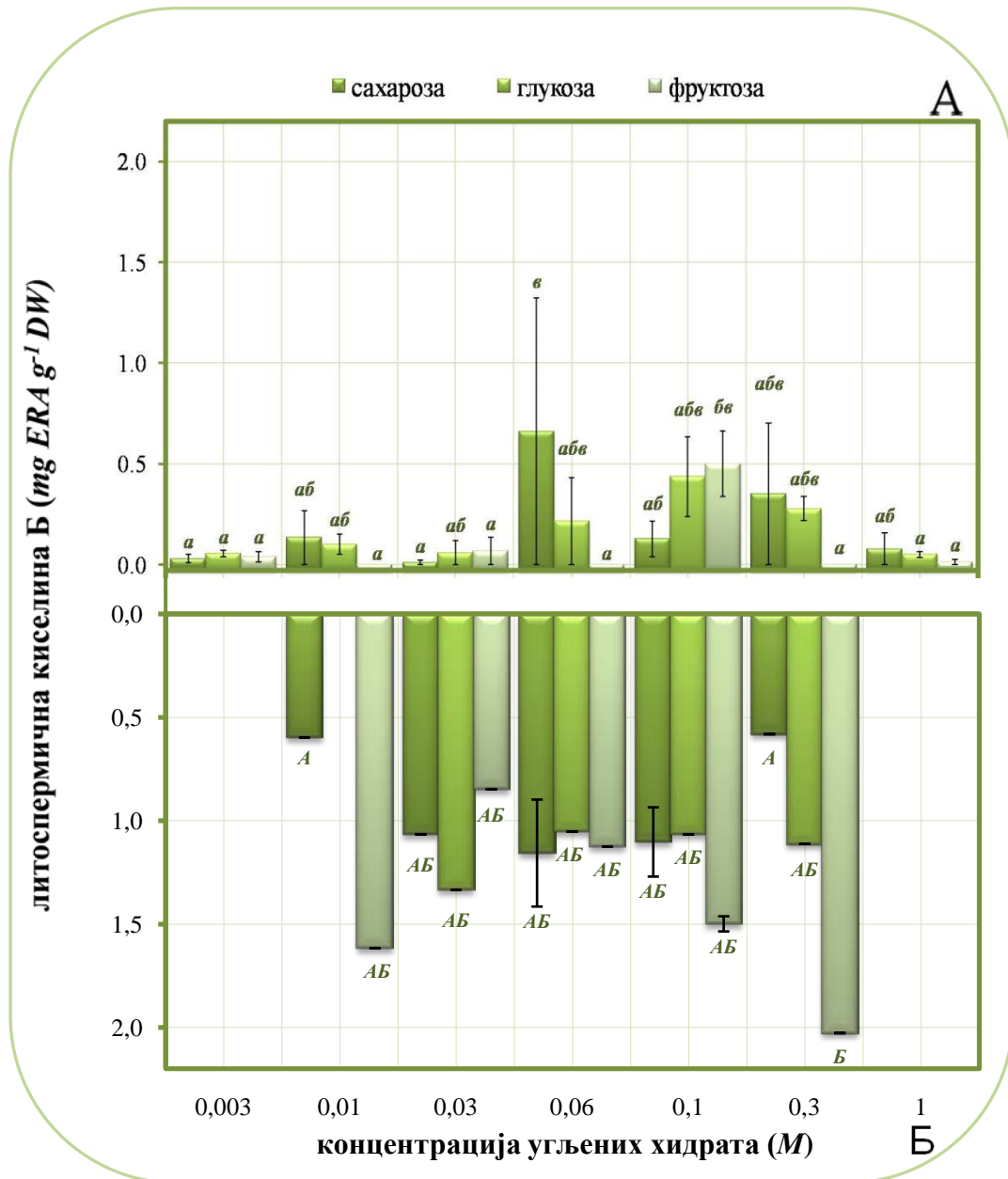
Слика 46 Садржај укупних флавоноида у изданцима (А) и кореновима (Б) биљака након четири недеље растења на хранљивој подлози са сахарозом, фруктозом и глукозом. Приказане вредности садржаја флавоноида у изданцима представљају средњу вредност 3 биолошка узорка мерена у по 3 техничка понављања $n = 9 \pm SE$, а у кореновима средњу вредност 2 биолошка узорка мерена у по 3 техничка понављања $n = 6 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).



Слика 47 Садржај рузмаринске киселине у изданцима (А) и кореновима (Б) биљака након четири недеље растења на хранљивој подлози са сахарозом, фруктозом и глукозом. Приказане вредности садржаја *RA* у изданцима представљају средњу вредност добијену мерењем 3 биолошка узорка $\pm SE$, а у кореновима представљају средњу вредност 2 биолошка узорка $\pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

Садржај *LAB* је вишеструко мањи у изданцима у односу на коренове биљака гајених 4 недеље на различитим шећерима (Слика 48). У изданцима биљака гајених на подлози са 0,06 M сахарозом садржај *LAB* износио је 0,66 mg ERA g⁻¹ DW, а у кореновима 1,15 mg ERA g⁻¹ DW. Највиши садржај *LAB*

($2,06 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$) измерен је у узорцима коренова на третману са $0,3 \text{ M}$ фруктозом. Количина *LAB* у кореновима била је уједначена у случају свих примењених шећера опсега концентрација од $0,03$ до $0,1 \text{ M}$ (Слика 48).



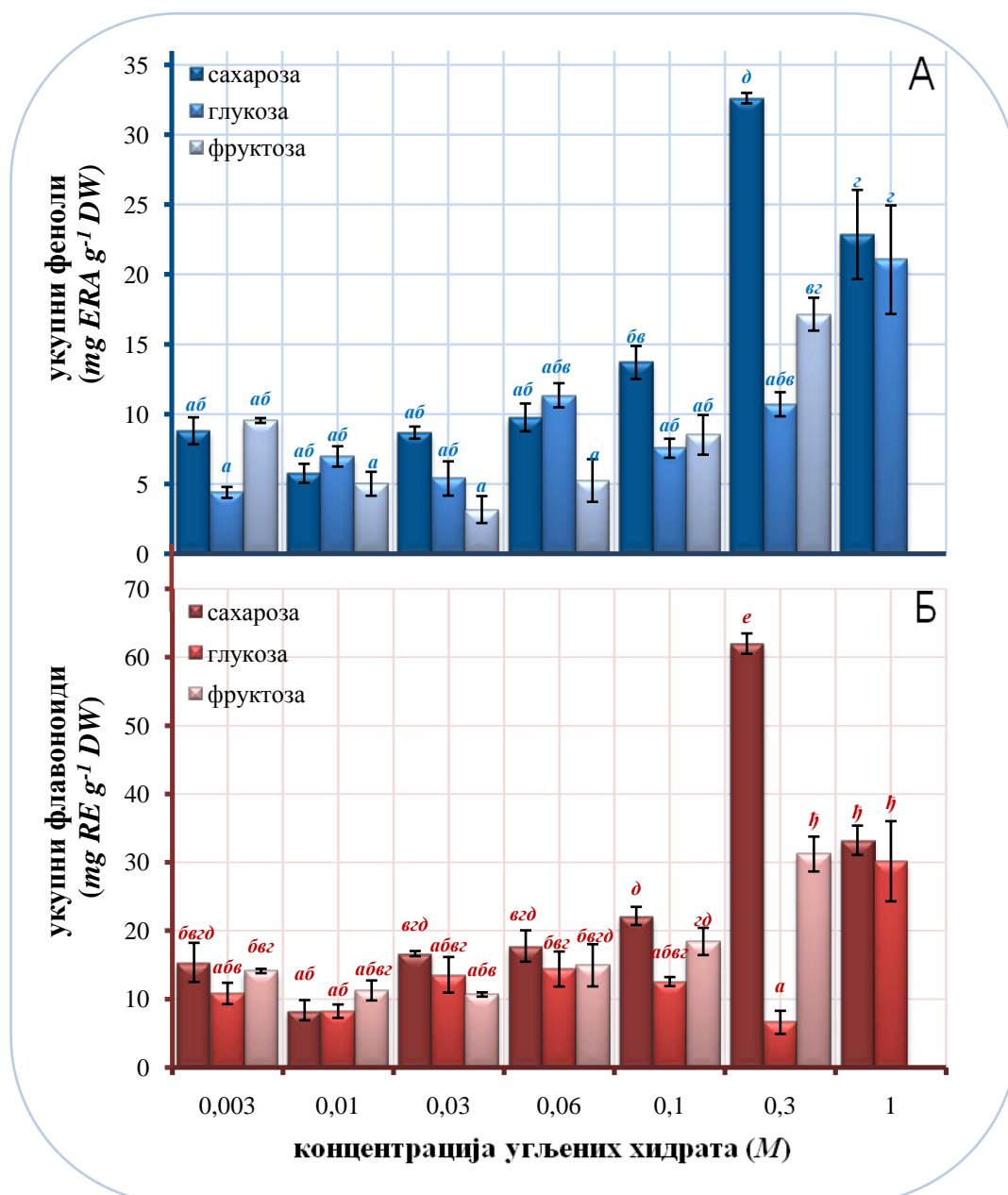
Слика 48 Садржај литоспермичне Б киселине у изданцима (А) и кореновима (Б) биљака након четири недеље растења на хранљивој подлози са сахарозом, фруктозом и глюкозом. Приказане вредности садржаја у изданцима представљају средњу вредност добијену мерењем 3 биолошка узорка $\pm SE$, а у кореновима представљају средњу вредност 2 биолошка узорка $\pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

Продукција укупних фенолних једињења у биљкама гајеним 6 недеља на подлози са 0,3 *M* сахарозом (32,62 *mg ERA g⁻¹ DW*, удео *RA* 7,73%) и 0,3 *M* фруктозом (17,15 *mg ERA g⁻¹ DW*, удео *RA* 8,80%) била је 2,4 односно 2,9 пута већа у односу на продукцију у биљкама старим 4 недеље. Највише укупних фенола у биљкама које су гајене под утицајем глукозе детектовано је при концентрацији шећера од 1 *M* (22,86 *mg ERA g⁻¹ DW*, удео *RA* 6,32%), што је 8,6 пута више у односу на биљке гајене 4 недеље (Слике 45 А и 49 А).

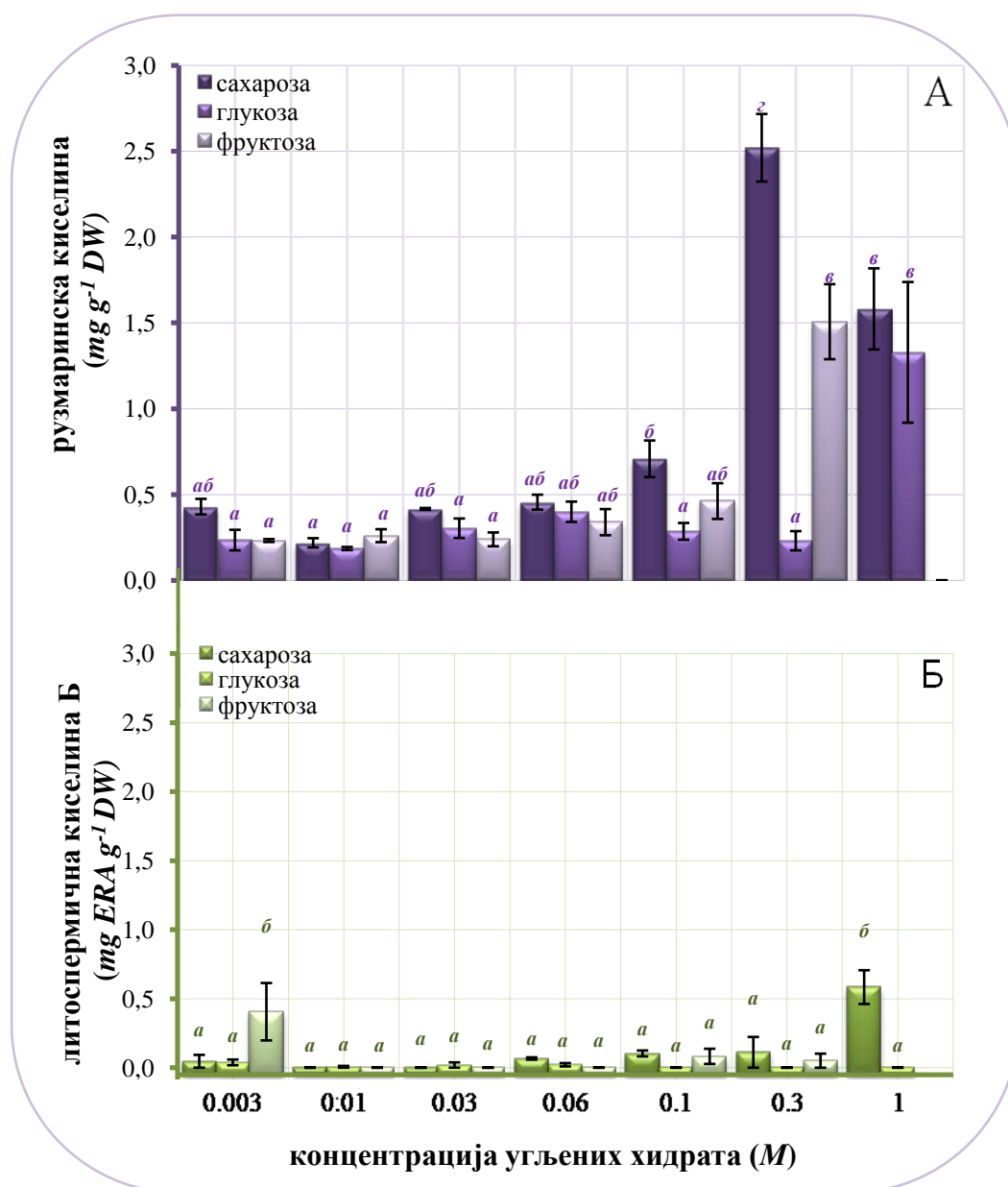
Максимална продукција флавоноида детектована је код биљака гајених на 0,3 *M* сахарози (61,97 *mg RE g⁻¹ DW*), што је повећање од 4,4 пута у односу на продукцију флавоноида при истим условима након 4 недеље. Повећање од 4,4 пута и вредност флавоноида од 30,16 *mg RE g⁻¹ DW* забележена је и код биљака гајених на 1 *M* глукози (Слике 46 Б и 49 Б).

Највиши ниво *RA* од 2,52 *mg g⁻¹ DW* измерен је у изданцима биљака гајених 6 недеља на подлози са 0,3 *M* сахарозом, што је 1,5 пута више у односу на садржај *RA* у биљкама старим 4 недеље (Слике 47 В и 50 А).

Продужено гајење од 6 недеља на различитим шећерима статистички значајно не утиче на повећање приноса *LAB* у изданцима. Изузетак су најнижа концентрација фруктозе (0,003 *M*) при којој је забележено 8 пута више *LAB* у односу на биљке гајене на сахарози и глукози, и највиша концентрација сахарозе (1 *M*) при којој је детектована повишен садржај *LAB* од 0,58 *mg ERA g⁻¹ DW* (Слика 50 Б).



Слика 49 Садржај укупних фенола (А) и флавоноида (Б) у изданцима биљака након шест недеља растења на хранљивој подлози са сахарозом, глукозом и фруктозом. Приказане вредности садржаја А и Б у изданцима представљају средњу вредност 3 биолошка узорка мерена у по 3 техничка понављања $n = 9 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

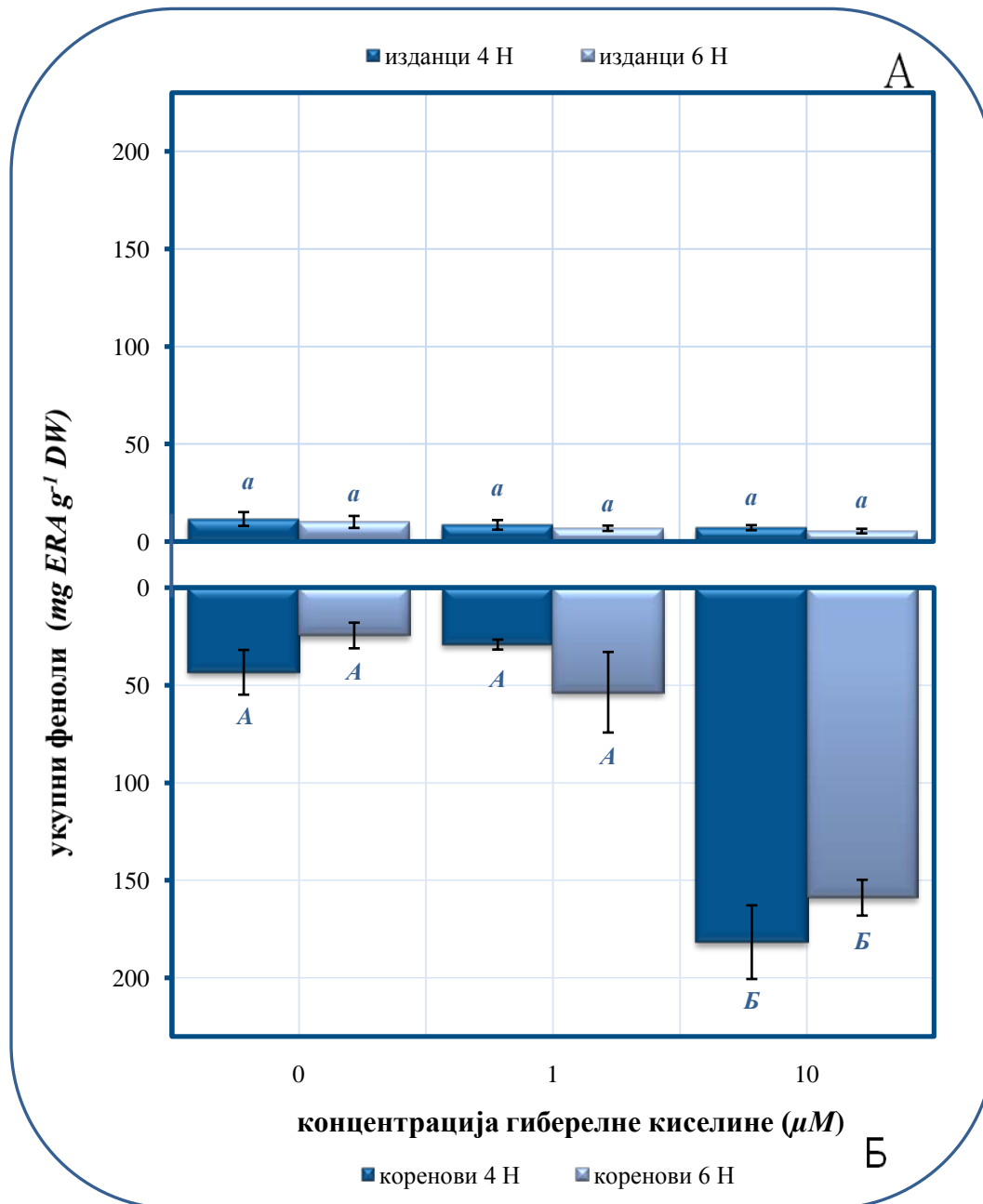


Слика 50 Садржај рузмаринске киселине (А) и литоспермичне Б киселине (Б) у изданцима биљака након шест недеља растења на хранљивој подлози са сахарозом, глукозом и фруктозом. Приказане вредности садржаја А и Б у изданцима представљају средњу вредност добијену мерењем 3 биолошка узорка $\pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

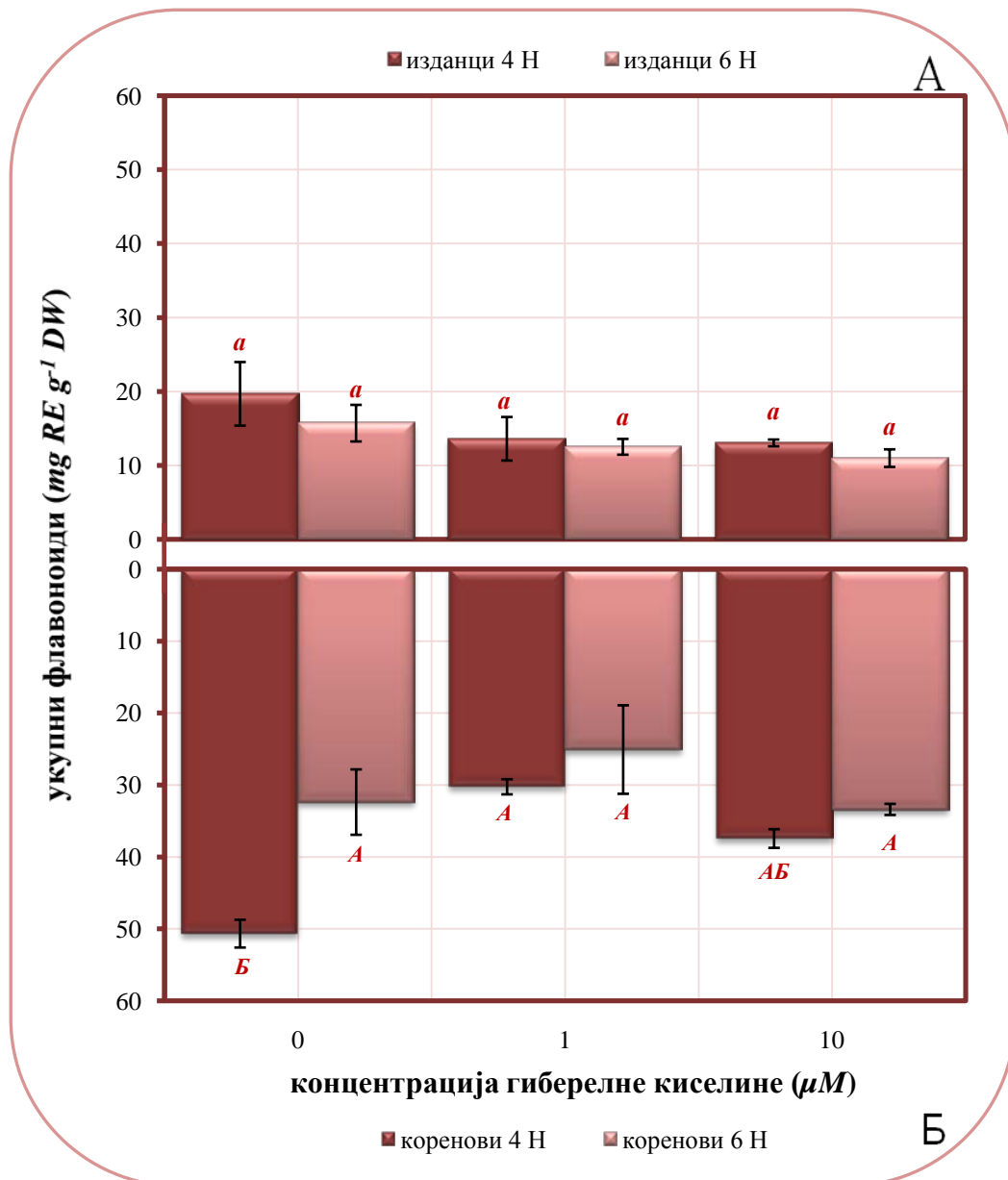
4.4.2.2. Утицај GA_3 на продукцију фенолних једињења *in vitro*

Повећање концентрације GA_3 у подлози за гајење није имало утицаја на продукцију анализираних фенолних једињења у изданцима (Слике 51А, 52 А, 53 А и 54 А). Удео RA у укупним фенолима изданака износио је између 2,5 и 7,5% (Слике 51 А и 53 А), а истовремено је удео LAB био између 2,2 и 9,8% (Слике 35 А и 38 А). У кореновима је садржај укупних фенола био виши у односу на садржај у изданцима и у њима је примећена зависност продукције анализираних једињења од одговарајуће концентрације GA_3 (Слике 51 Б, 52 Б, 53 Б и 54 Б). Применом GA_3 у концентрацији од $10 \mu M$ у кореновима је након 4 недеље продукција укупних фенола била 4,2 пута виша него у кореновима контролних биљака и износила је $181,68 \text{ mg ERA g}^{-1} DW$. Након 6 недеља гајења биљака на истом третману, садржај укупних фенола у кореновима био је 6,5 пута виши ($158,89 \text{ mg ERA g}^{-1} DW$), са уделом RA од приближно 0,2% и уделом LAB од 1,1% (Слике 51 Б, 53 Б и 54 Б).

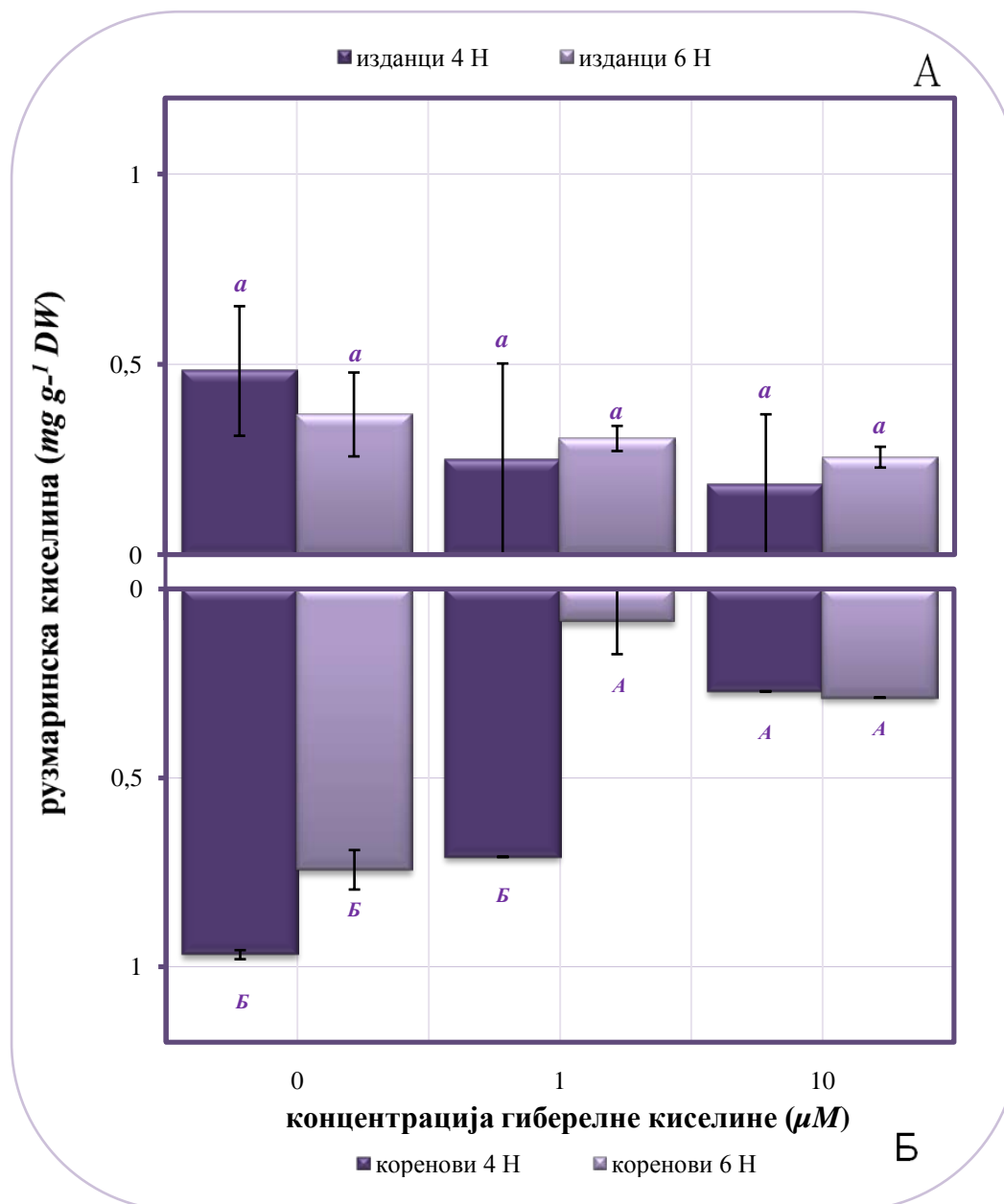
Садржај флавоноида, RA и LAB у кореновима опадао је сразмерно повећању концентрације GA_3 , са највишим вредностима у контролним биљкама ($50,66 \text{ mg RE g}^{-1} DW$ и $0,97 \text{ RA mg g}^{-1} DW$, $2,24 \text{ mg ERA g}^{-1} DW$; Слике 52 Б, 53 Б и 54 Б). Продукција флавоноида је била већа у кореновима у односу на изданке до 2,5 пута. Са повећањем концентрације GA_3 у подлози дистрибуција RA је постала равномернија између изданака и коренова (Слика 51 Б). При концентрацији од $10 \mu M$ GA_3 и након 4 недеље гајења, садржај LAB у кореновима ($1,89 \text{ mg ERA g}^{-1} DW$) је износио 9,9 пута више у односу на изданке ($0,17 \text{ mg ERA g}^{-1} DW$) и 10 пута ниже у односу на контролну групу биљака ($1,14 \text{ mg ERA g}^{-1} DW$). У старијим биљкама није детектована статистички значајна разлика у количини LAB између контролне и третиране групе.



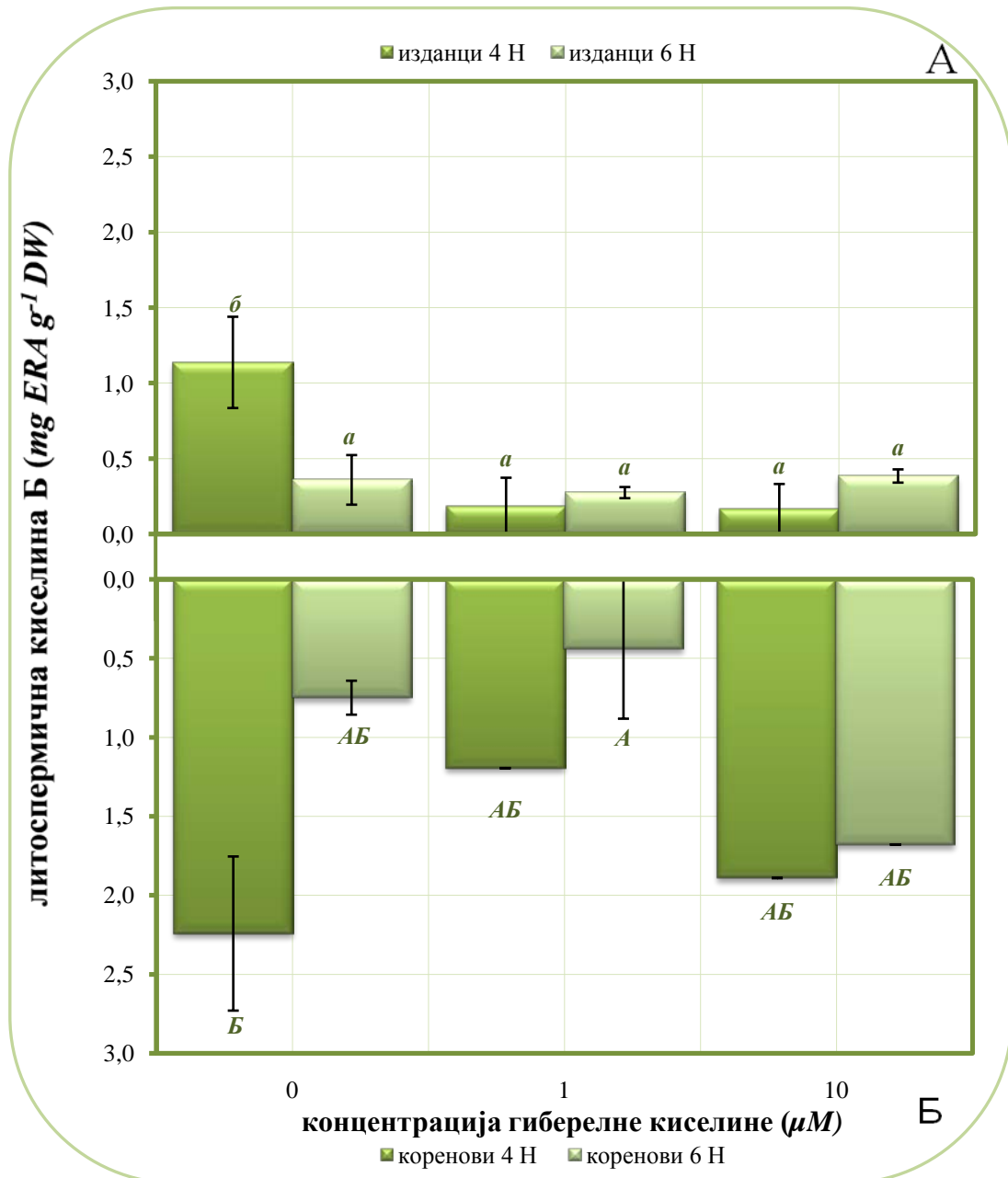
Слика 51 Садржај укупних фенола у изданцима (А) и кореновима (Б) биљака након четири (4 Н) и шест недеља (6 Н) растења на хранљивој подлози са различитим концентрацијама GA_3 . Контролне групе биљака су гајене на подлози без додатка GA_3 . Приказане вредности садржаја у изданцима и кореновима биљака старих 4 недеље и у кореновима биљака старих 6 недеља представљају средњу вредност 2 биолошка узорка мерена у по 3 техничка понављања $n = 6 \pm SE$, а у изданцима старим 6 недеља средњу вредност 3 биолошка узорка мерена у по 3 техничка понављања $n = 9 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).



Слика 52 Садржај укупних флавоноида у изданцима (А) и кореновима (Б) биљака након четири (4 Н) и шест недеља (6 Н) растења на хранљивој подлози са различитим концентрацијама GA_3 . Контролне групе биљака су гајене на подлози без додатка GA_3 . Приказане вредности садржаја у изданцима и кореновима биљака старих 4 недеље и у кореновима биљака старих 6 недеља представљају средњу вредност 2 биолошка узорка мерена у по 3 техничка понављања $n = 6 \pm SE$, а у изданцима старим 6 недеља средњу вредност 3 биолошка узорка мерена у по 3 техничка понављања $n = 9 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).



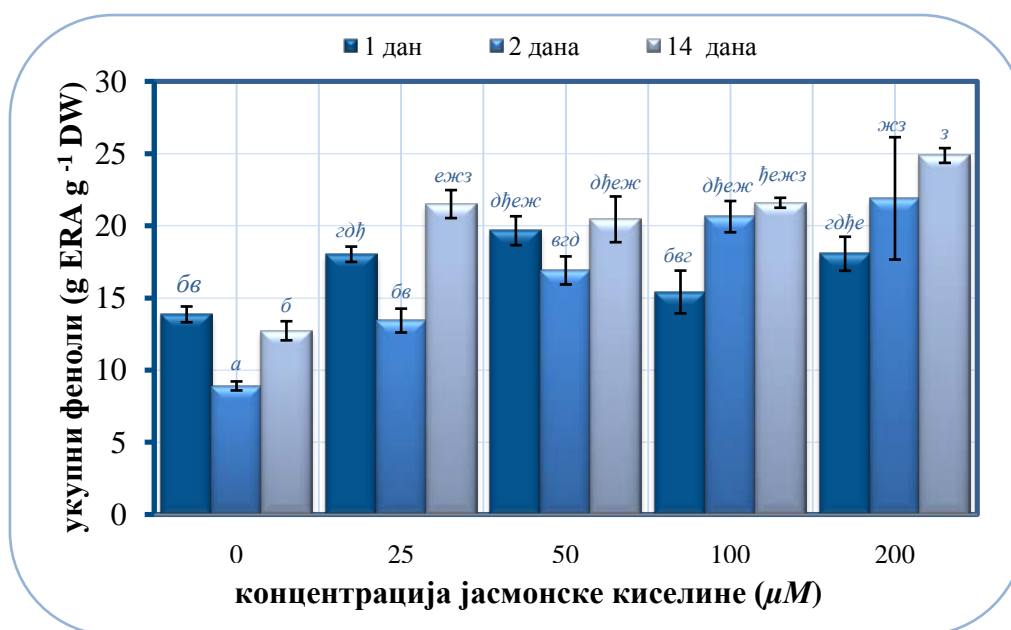
Слика 53 Садржај рузмаринске киселине у изданцима (А) и кореновима (Б) биљака након четири (4 Н) и шест недеља (6 Н) растења на хранљивој подлози са различитим концентрацијама GA_3 . Контролне групе биљака су гајене на подлози без додатка GA_3 . Приказане вредности садржаја у изданцима и кореновима биљака старих 4 недеље и у кореновима биљака старих 6 недеља представљају средњу вредност добијену мерењем 2 биолошка узорка $\pm SE$, а у изданцима старим 6 недеља средњу вредност 3 биолошка узорка $\pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).



Слика 54 Садржај литоспермичне Б киселине у изданцима (А) и кореновима (Б) биљака након четири (4 Н) и шест недеља (6 Н) растења на хранљивој подлози са различитим концентрацијама GA_3 . Контролне групе биљака су гајене на подлози без додатка GA_3 . Приказане вредности садржаја у изданцима и кореновима биљака старих 4 недеље и у кореновима биљака старих 6 недеља представљају средњу вредност добијену мерењем 2 биолошка узорка $\pm SE$, а у изданцима старим 6 недеља средњу вредност 3 биолошка узорка $\pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

4.4.2.3. Утицај *JA* на продукцију фенолних једињења *in vitro*

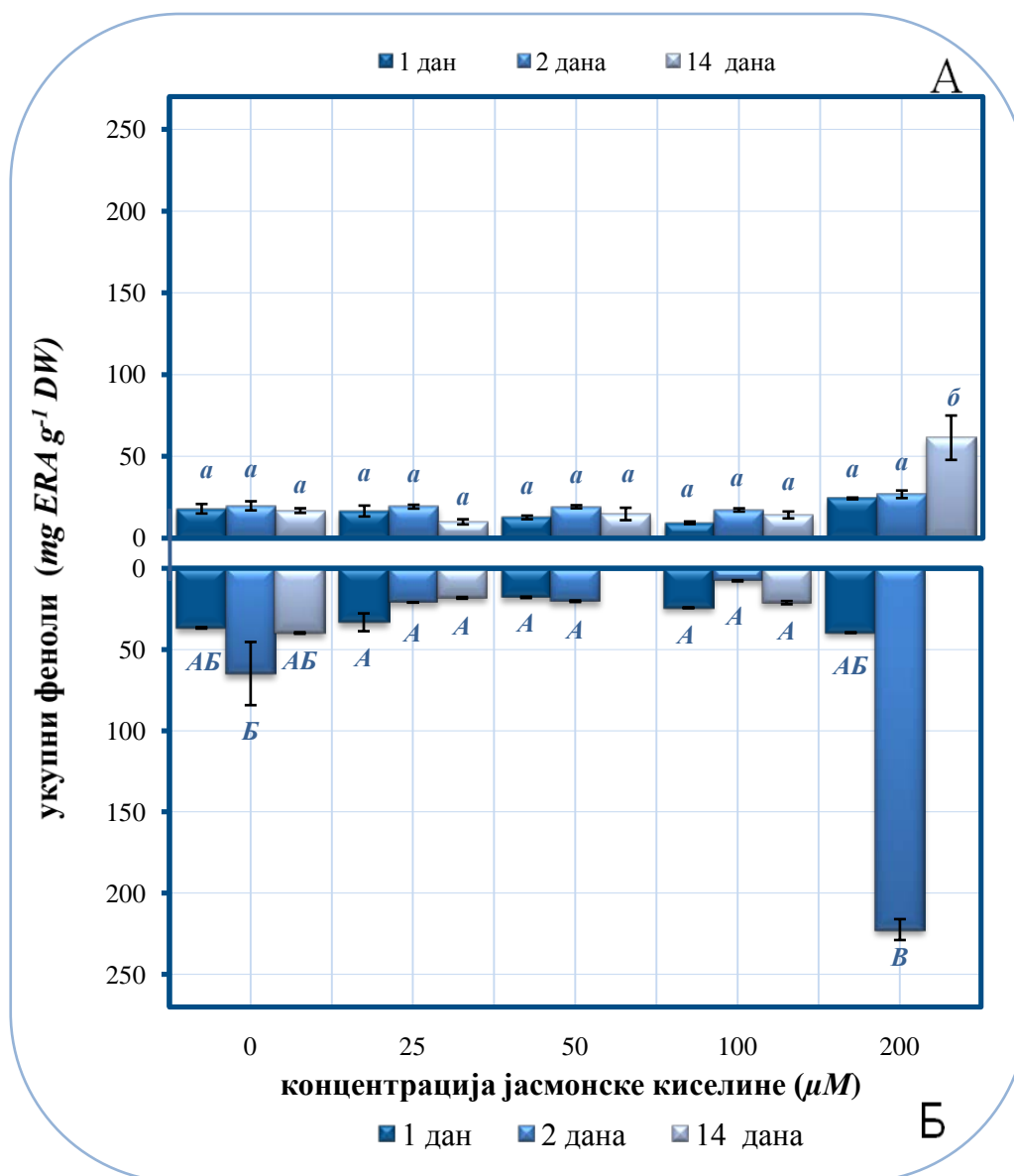
Повећање концентрације *JA* у подлози и продужавање трајања третмана утицало је на повећање продукције укупних фенола у изданцима. Највиши садржај укупних фенола $24,86 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$ измерен је у узорцима изданака биљака гајених на концентрацији од $200 \mu\text{M JA}$ током 14 дана, што је двоструко више у односу на контролне биљке (Слика 55).



Слика 55 Садржај укупних фенола у изданцима биљака непосредно након третмана *JA* у трајању од 1 до 14 дана. Контролне групе биљака су гајене на подлози без додатка *JA*. Приказане вредности садржаја у изданцима представљају средњу вредност 6 биолошких узорка мерена у по 2 техничка понављања $n = 12 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

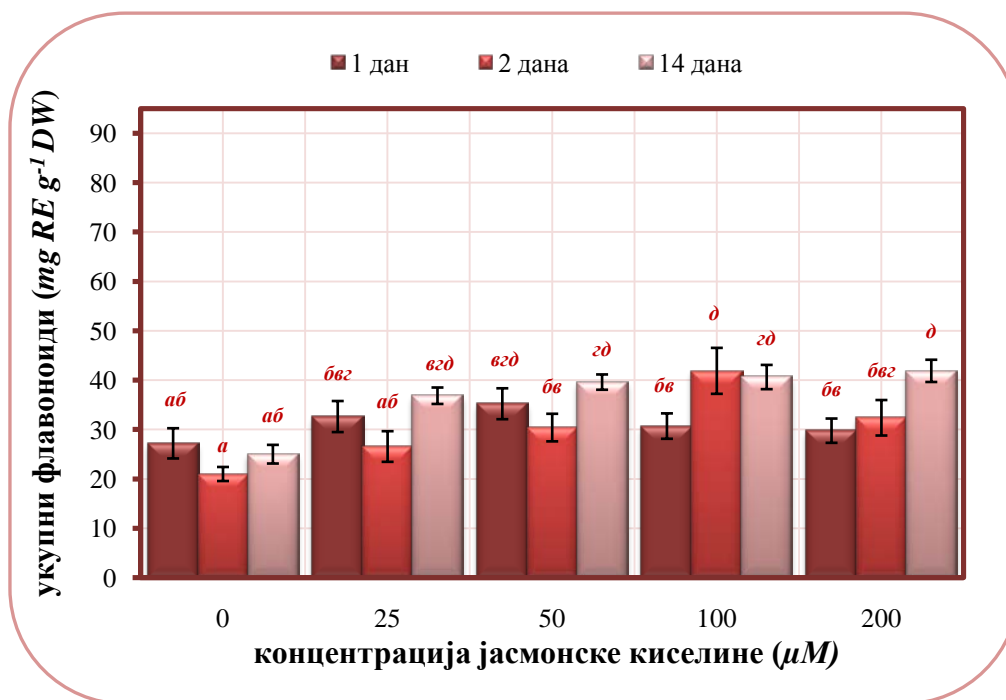
У узорцима изданака биљака гајених још 14 дана без утицаја *JA* ниво фенолних једињења се уједначио независно од претходног третмана. Једино одступање је измерено код најстаријих биљака, претходно гајених на подлози са $200 \mu\text{M JA}$. На овом третману измерена је вредност $61,28 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$, што је 3,7 пута више од вредности измерене у контролним биљкама и 2,5 пута више од максималне вредности забележене након директног третмана *JA* (Слике 55 и 56 А).

Све биљке на опоравку формирале су коренове, осим оних које су гајене на $200 \mu\text{M JA}$ у трајању од 14 дана (Слика 56 А). Највећа продукције укупних фенола ($222,35 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$) измерена је у кореновима биљака које су претходно расле 2 дана под утицајем $200 \mu\text{M JA}$ (Слика 56 Б).



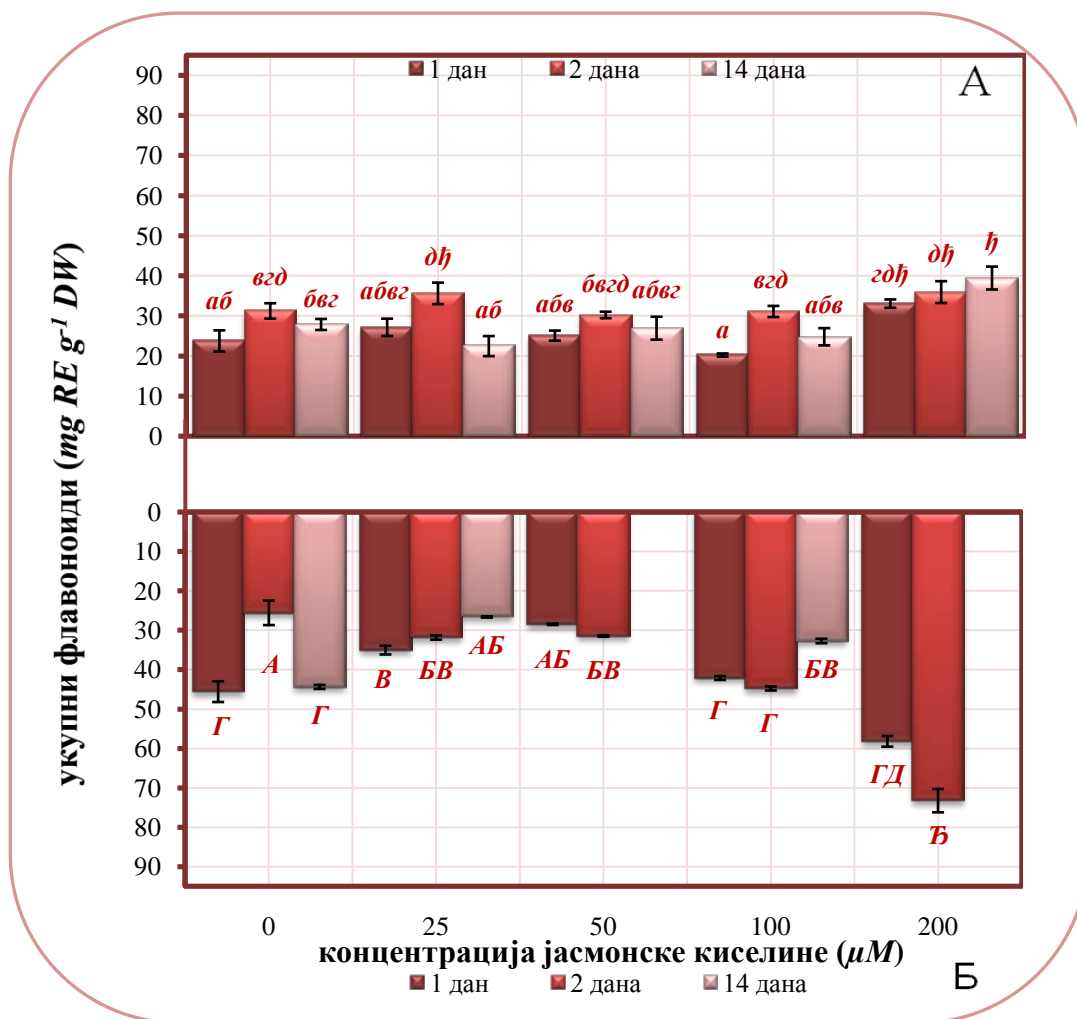
Слика 56 Садржај укупних фенола у изданцима (А) и кореновима (Б) биљака након опоравка на МС подлози са 0,1 М сахарозом без хормона у након третмана JA у трајању од 1 до 14 дана. Контролне групе биљака су гајене на подлози без додатка JA . Приказане вредности садржаја у изданцима представљају 5 биолошких узорка мерена у по 2 техничка понављања $n = 10 \pm SE$, а у кореновима средњу вредност добијену мерењем техничких понављања $n = 4 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

Ниво флавоноида у изданцима биљака непосредно након третмана *JA* је растао до вредности $41,90 \text{ mg RE g}^{-1} \text{ DW}$, која је достигнута при концентрацијама од $100 \mu\text{M JA}$ (дужина трајања третмана 2 дана) и $200 \mu\text{M JA}$ (дужина трајања третмана 14 дана; Слика 57).



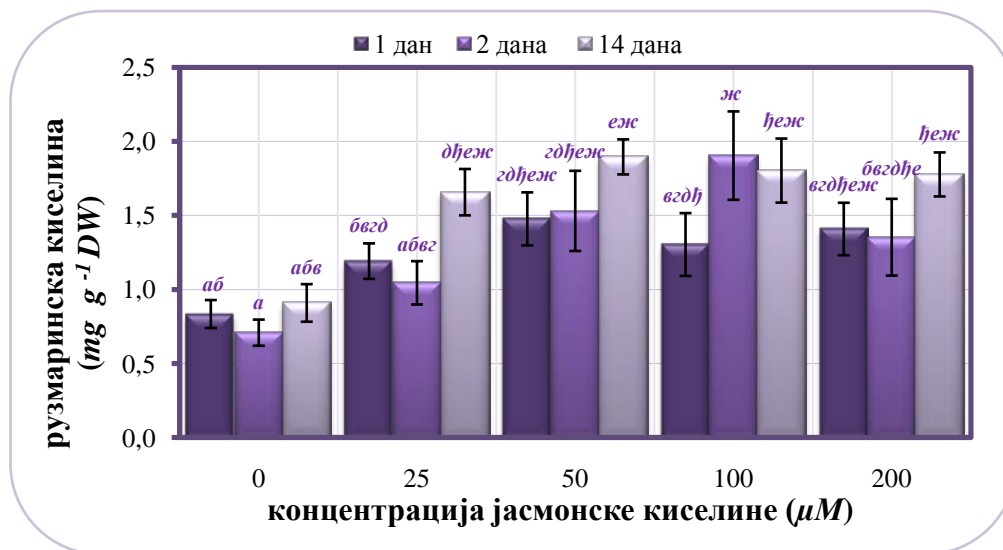
Слика 57 Садржај укупних флавоноида у изданцима биљака непосредно након третмана *JA* у трајању од 1 до 14 дана. Контролне групе биљака су гајене на подлози без додатка *JA*. Резултати представљају средњу вредност 6 биолошких узорка мерена у по 2 техничка понављања $n = 12 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

Најдужи претретман и највиша концентрација *JA* значајно су утицали на повећање продукције флавоноида у изданцима биљака на опоравку. Коренови биљака које су претходно два дана биле изложене утицају $200 \mu\text{M JA}$ садржали су више флавоноида ($73,27 \text{ mg RE g}^{-1} \text{ DW}$) у односу на коренове свих осталих биљака на опоравку (Слика 58 А и Б).



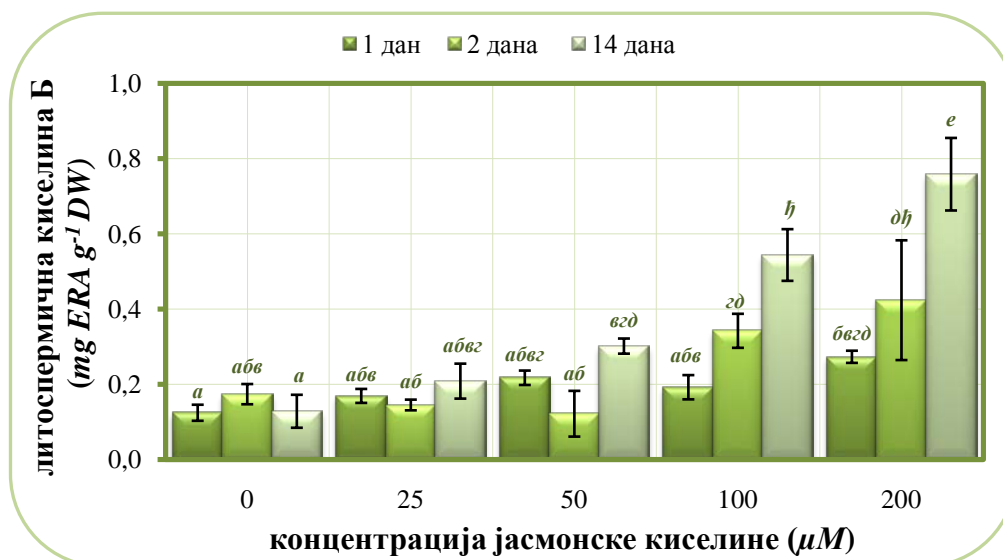
Слика 58 Садржај укупних флавоноида у изданцима (А) и кореновима (Б) биљака након опоравка на МС подлози са 0,1 М сахарозом без хормона након третмана ЈА у трајању од 1 до 14 дана. Контролне групе биљака су гајене на подлози без додатка ЈА. Садржај у изданцима представља средњу вредност 5 биолошких узорка мерена у по 2 техничка понављања $n = 10 \pm SE$, а у кореновима средњу вредност добијену мерењем техничких понављања $n = 4 \pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

Јасмонска киселина је током примене у различитим концентрацијама и дужини трајања утицала на повећање продукције RA , али до одређеног нивоа од $1,90 \text{ mg g}^{-1} DW$ изнад ког није било даљег повећања, без обзира на продужено излагање (Слика 59). Максимум продукције RA у оквиру једног временског третмана није био забележен на максималној концентрацији ЈА. Највиши садржај RA $1,90 \text{ mg g}^{-1} DW$ имали су изданци биљака гајени 2 дана на концентрацији од $100 \mu M JA$.



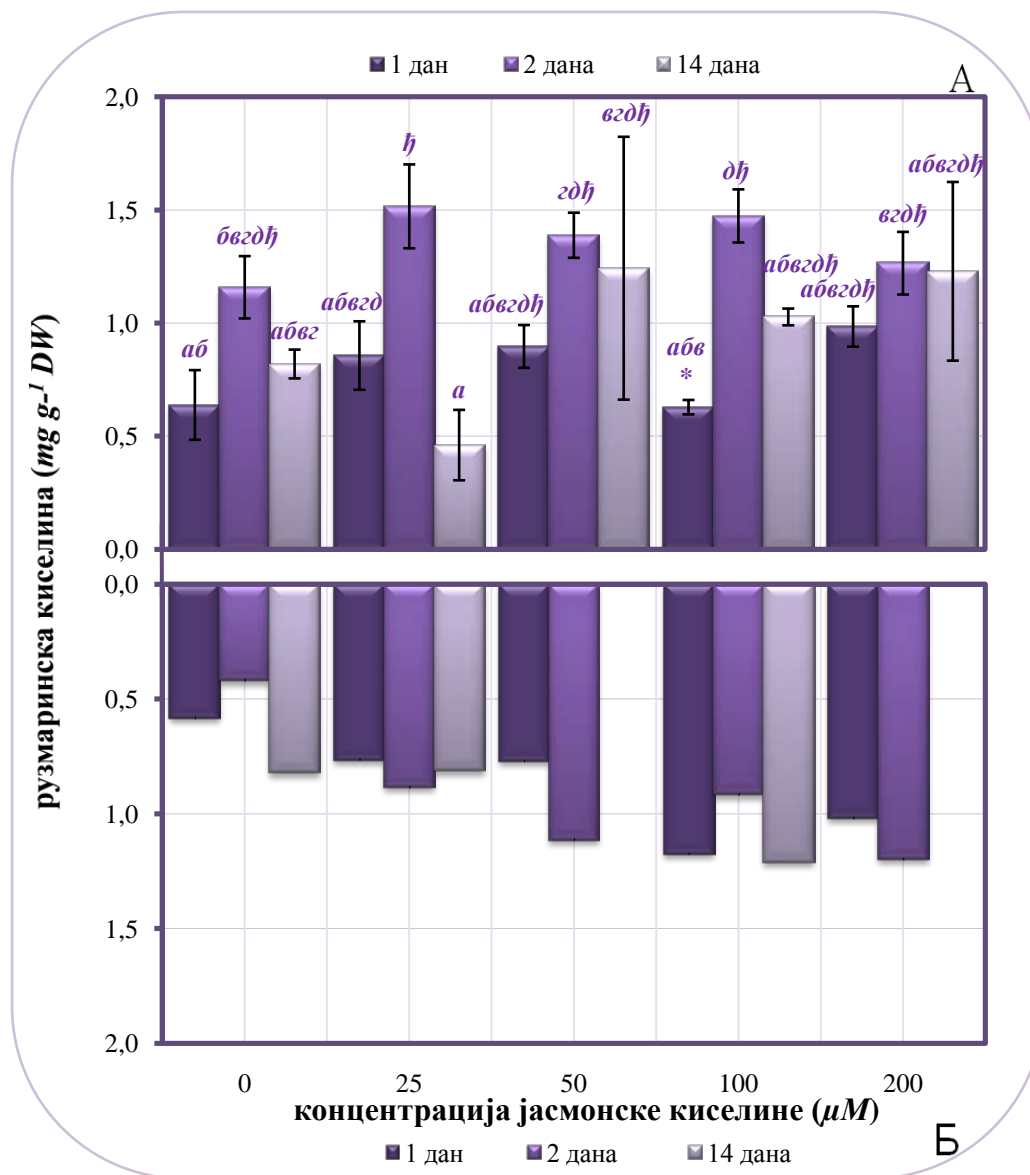
Слика 59 Садржај рузмариинске киселине у изданцима биљака непосредно након третмана *JA* у трајању од 1 до 14 дана. Контролне групе биљака су гајене на подлози без додатка *JA*. Резултати представљају средњу вредност добијену мерењем 6 биолошких узорка $\pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

Концентрација *LAB* у изданцима биљака расте сразмерно примењеној концентрацији *JA* и дужини изложености њеном утицају до максималне вредности од $0,76 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$ при концентрацији од $200 \mu\text{M}$ и трајању од 14 дана (Слика 60).



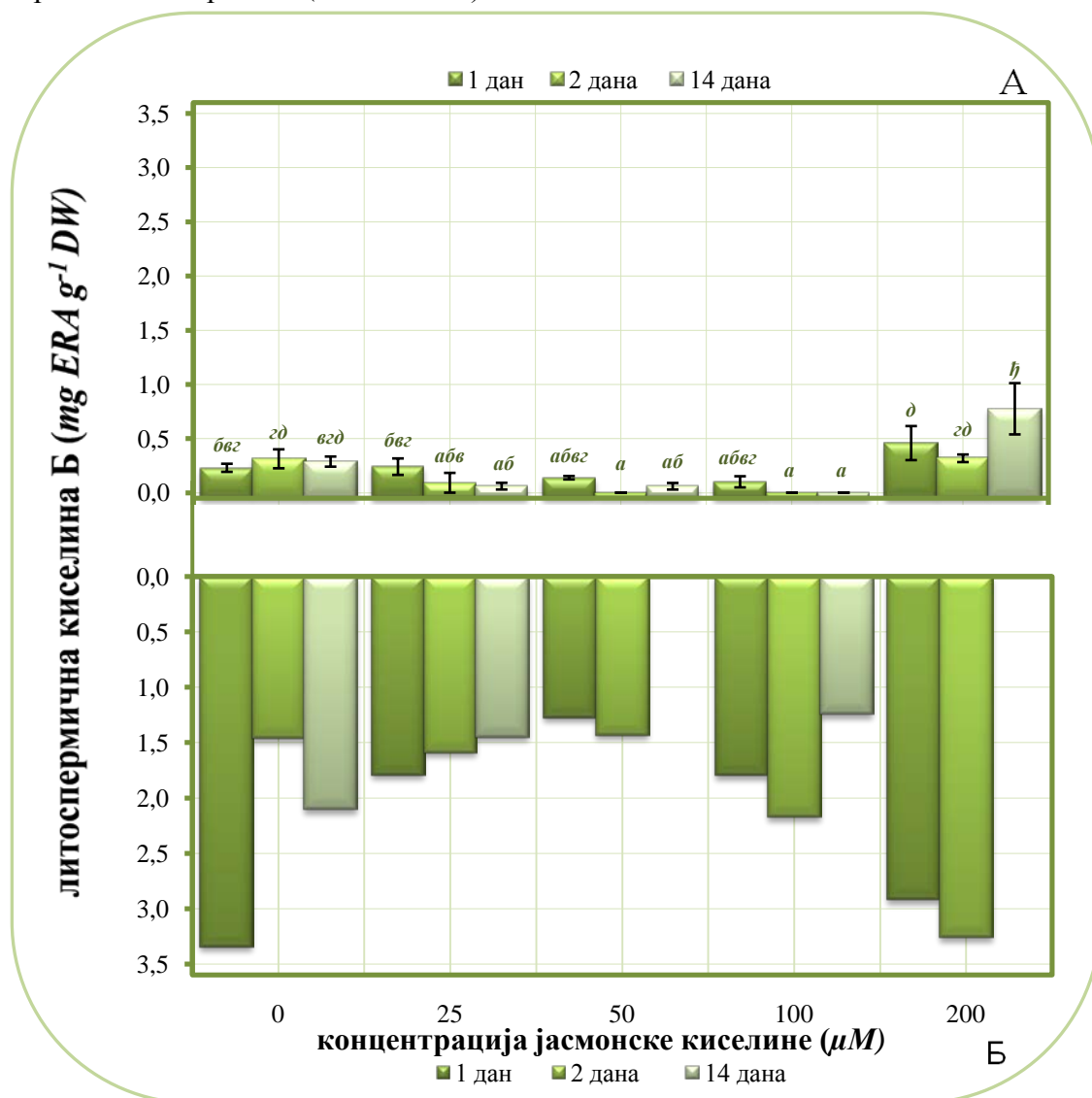
Слика 60 Садржај литоспермичне Б киселине у изданцима биљака непосредно након третмана *JA* у трајању од 1 до 14 дана. Контролне групе биљака су гајене на подлози без додатка *JA*. Резултати представљају средњу вредност добијену мерењем 6 биолошких узорка $\pm SE$. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

У изданцима биљака на опоравку највиши садржај *RA* измерен је код биљака претходно гајених 2 дана у опсегу концентрација *JA* од 25-100 μM и износио је 1,38-1,52 $\text{mg g}^{-1} \text{DW}$ (Слика 61 А).



Слика 61 Садржај рузмаринске киселине у изданцима (А) и кореновима (Б) биљака након опоравка на МС подлози са 0,1 М сахарозом без хормона након третмана *JA* у трајању од 1 до 14 дана. Контролне групе биљака су гајене на подлози без додатка *JA*. Садржај *RA* у изданцима представља средњу вредност добијену мерењем 6 биолошких узорка $\pm SE$, а у кореновима су приказане вредности добијене мерењем једног биолошког понављања. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

Након опоравка садржај *LAB* у изданцима био је нижи у односу на млађе биљке са директног третмана *JA* (Слика 62 А). Насупрот томе, у кореновима је измерена вишеструко виша количина *LAB*. Садржај *LAB* се једино није мењао у изданцима биљака претходно гајених 14 дана на највишој концентрацији *JA*, а без образованих коренова (Слика 62 Б).



Слика 62 Садржај литоспермичне Б киселине у изданцима (А) и кореновима (Б) биљака након опоравка на МС подлози са 0,1 М сахарозом без хормона након третмана *JA* у трајању од 1 до 14 дана. Контролне групе биљака су гајене на подлози без додатка *JA*. Садржај у изданцима представља средњу вредност добијену мерењем 6 биолошких узорка $\pm SE$, а у кореновима су приказане вредности добијене мерењем једног биолошког понављања. Статистички значајну разлику не показују вредности означене истим словом ($p \leq 0,05$).

4.5. Антиоксидативна својства биљака из природе и биљака гајених *in vitro*

Због високог садржаја фенолних једињења у метанолним екстрактима биљака *R. umbellata* из природе и гајених *in vitro* одређивана је њихова антиоксидативна активност. Забележене су значајне разлике између појединих третмана, али и између активности у изданцима и кореновима биљака са истих третмана. Резултати оба теста су ради лакшег поређења изражавани као IC_{50} преко еквивалента рузмаринске киселине, као најзаступљеније антиоксидативне компоненте. Ниске вредности IC_{50} означавају високу антиоксидативну активност узорка.

Помоћу теста са гашењем *DPPH*[•] радикала утврђено је да постоје статистички значајна разлика у антиоксидативној активности различитих делова биљке из природе (Табела 18). Најнижу антиоксидативну активност има стабло чија IC_{50} износи $38,68 \text{ mM ERA g}^{-1} \text{ DW}$, а највишу корен са IC_{50} од $1,71 \text{ mM ERA g}^{-1} \text{ DW}$. *ABTS* тестом смо потврдили претходно наведене резултате. Ефикасне концентрације утврђене *ABTS* тестом код биљака из природе су 4 пута ниже од IC_{50} одређених у *DPPH* тесту (Табела 18).

Табела 18 Антиоксидативна активност метанолних екстраката појединих делова биљака *R. umbellata* из природе. Резултати су изражени као IC_{50} вредност и представљају средње вредности три биолошка узорка $\pm SE$. Статистички значајну разлику на нивоу значајности $p \leq 0,05$ не показују вредности означене истим словом.

део биљке	$IC_{50} (\text{mM RA g}^{-1} \text{ DW})$					
	<i>DPPH</i> [•]			<i>ABTS</i> ^{•+}		
рузмаринска киселина	0,16	±	0,01	0,14	±	0,00
отворени цветови	4,14 а	±	0,77	1,15 А	±	0,28
затворени цветови	5,68 а	±	0,84	1,80 А	±	0,16
стабло	38,68 б	±	14,03	10,60 Б	±	3,35
листови из розете	2,31 а	±	0,23	0,77 А	±	0,01
корен	1,71 а	±	0,54	0,68 А	±	0,36

4.5.1. Ефекат угљених хидрата

Између екстраката изданака биљака гајених 4 недеље на различитим концентрацијама угљених хидрата утврђене су статистички значајне разлике у антиоксидативној активности (Табела 19). Антиоксидативна активност је расла са порастом примењене концентрације за све испитиване угљене хидрате. Највећу антиоксидативну активност имале су биљке гајене на подлози са 0,3 М фруктозе током 4 недеље, чак 1,99 mM ERA $g^{-1} DW$. Ефикасне концентрације утврђене ABTS тестом су око 3 пута ниже од IC₅₀ одређених помоћу DPPH.

Табела 19 Антиоксидативна активност метанолних екстраката изданака након четири недеље растења на хранљивој подлози са сахарозом, глукозом и фруктозом. Резултати су изражени као средње IC₅₀ вредности ($n = 3 \pm SE$). Статистички значајну разлику на нивоу значајности $p \leq 0,05$ не показују вредности означене истим словом.

Угљени хидрат	концентрација угљених хидрата (M)	IC ₅₀ (mM RA $g^{-1} DW$)					
		DPPH*			ABTS**		
сахароза	0,003	6,20 б	±	1,19	2,44 АБВ	±	1,03
	0,1	2,31 а	±	0,42	1,08 АБ	±	0,03
	0,3	2,50 а	±	0,00	1,21 АБ	±	0,02
глукоза	0,003	9,31 в	±	1,27	2,97 БВ	±	0,32
	0,1	2,79 а	±	0,74	1,49 АБ	±	0,61
	0,3	2,06 а	±	0,04	0,90 А	±	0,02
фруктоза	0,003	10,02 в	±	1,44	3,70 В	±	1,03
	0,1	3,68 аб	±	0,73	1,66 АБ	±	0,42
	0,3	1,99 а	±	0,37	0,79 А	±	0,21

Оба примењена теста за одређивање антиоксидативне активности су потврдила утицај примењених угљених хидрата на антиоксидативну активност у кореновима биљака гајених 4 недеље, и то знатно више изражену при вишим концентрацијама хексоза (Табела 20).

Табела 20 Антиоксидативна активност метанолних екстраката коренова након четири недеље растења на хранљивој подлози са сахарозом, глукозом и фруктозом. Резултати су изражени као средње IC_{50} вредности ($n = 2 \pm SE$). Статистички значајну разлику на нивоу значајности $p \leq 0,05$ не показују вредности означене истим словом.

Угљени хидрат	концентрација угљених хидрата (M)	IC_{50} (mM RA g-IDW)					
		DPPH•			ABTS•+		
сахароза	0,003	--	±		--	±	
	0,1	0,88 в	±	0,11	0,69 В	±	0,08
	0,3	1,34 Г	±	0,03	1,04 Г	±	0,04
глукоза	0,003	--	±		--	±	
	0,1	0,94 в	±	0,07	0,57 БВ	±	0,01
	0,3	0,63 аб	±	0,01	0,33 А	±	0,01
фруктоза	0,003	--	±		--	±	
	0,1	0,84 бв	±	0,01	0,49 АБ	±	0,02
	0,3	0,55 а	±	0,05	0,31 А	±	0,01

Антиоксидативна активност старијих изданака је већа у поређењу са одговарајућим вредностима млађих биљака (Табеле 19 и 21). Биљке гајене 6 недеља на сахарози и фруктози показале су значајну разлику у антиоксидативној активности, сразмерно примењеној концентрацији угљених хидрата. Највећу антиоксидативну активност показују изданци биљака гајени 6 недеља на подлози са 0,3 M сахарозом (Табела 21).

Табела 21 Антиоксидативна активност метанолних екстраката изданака након шест недеља растења на хранљивој подлози са сахарозом, глукозом и фруктозом. Резултати су изражени као средње IC_{50} вредности ($n = 3 \pm SE$). Статистички значајну разлику на нивоу значајности $p \leq 0,05$ не показују вредности означене истим словом.

Угљени хидрат	концентрација угљених хидрата (M)	IC_{50} (mM RA g ⁻¹ DW)					
		DPPH•			ABTS•+		
сахароза	0,003	1,76 абв	±	0,41	1,11 БВ	±	0,19
	0,1	2,07 бвг	±	0,33	1,06 БВ	±	0,16
	0,3	0,52 а	±	0,04	0,27 А	±	0,01
глукоза	0,003	4,00 д	±	0,78	2,24 Д	±	0,34
	0,1	3,32 гд	±	0,27	1,88 ГД	±	0,14
	0,3	4,33 д	±	0,87	2,01 ГД	±	0,19
фруктоза	0,003	2,20 бвг	±	0,06	1,12 БВ	±	0,09
	0,1	2,68 вг	±	0,23	1,55 ВГ	±	0,26
	0,3	1,21 аб	±	0,29	0,60 АБ	±	0,09

4.5.2. Ефекат GA_3

Екстракти изданака и коренова биљака гајених 4 и 6 недеља на различитим концентрацијама GA_3 нису показали статистички значајне разлике у антиоксидативној активности у поређењу са контролним биљкама. Коренови биљака на свим третманима имали су статистички значајно вишу антиоксидативну активност од изданака (Табела 22). У свим тестираним биљним екстрактима ефикасне концентрације утврђене *ABTS* тестом су биле 1,3 пута ниже од IC_{50} одређених помоћу *DPPH* теста.

Табела 22 Антиоксидативна активност метанолних екстраката изданака и коренова биљака након четири (4 Н) и шест недеља (6 Н) растења на хранљивој подлози са различитим концентрацијама GA_3 . Резултати су изражени као средње IC_{50} вредности (у изданцима и кореновима биљака старих 4 недеље и у кореновима биљака старих 6 недеља $n = 2 \pm SE$, а у изданцима старим 6 недеља $n = 3 \pm SE$). Статистички значајну разлику на нивоу значајности $p \leq 0,05$ у оквиру различитих временских третмана не показују вредности означене истим словом. Статистички значајне разлике ($p \leq 0,05$) између вредности у изданцима и кореновима са истих временских третмана означене су црвеним словима.

део биљке и старост	концентрација GA_3 (μM)	IC_{50} ($mM RA g^{-1} DW$)					
		<i>DPPH</i>			<i>ABTS</i> ⁺		
изданци 4 Н	0	1,91 a	±	1,05	1,49 a	±	0,90
	1	2,40 a	±	0,91	1,75 a	±	0,60
	10	1,98 a	±	0,04	1,42 a	±	0,00
изданци 6 Н	0	1,95 a	±	0,42	1,36 a	±	0,33
	1	2,21 a	±	0,13	1,42 a	±	0,16
	10	2,24 a	±	0,16	1,54 a	±	0,14
коренови 4 Н	0	0,52 A	±	0,04	0,33 A	±	0,05
	1	0,73 A	±	0,01	0,58 A	±	0,01
	10	0,59 A	±	0,01	0,45 A	±	0,02
коренови 6 Н	0	0,96 A	±	0,34	0,66 A	±	0,18
	1	1,11 A	±	0,45	0,67 A	±	0,40
	10	0,79 A	±	0,02	0,48 A	±	0,00

4.5.3. Ефекат *JA*

IC_{50} вредности добијене помоћу *DPPH* и *ABTS* теста показале су да се под утицајем виших концентрација *JA* повећава антиоксидативна активност биљака (Табела 23). Приликом дужег излагања вишим концентрацијама *JA* (до 14 дана) антиоксидативна активност је била скоро двоструко већа у односу на вредности у контролним биљкама.

Табела 23 Антиоксидативна активност метанолних екстраката изданака непосредно након третмана јасмонском киселином у трајању од 1 до 14 дана. Резултати су изражени као средње IC_{50} вредности ($n = 6 \pm SE$). Статистички значајну разлику на нивоу значајности $p \leq 0,05$ не показују вредности означене истим словом.

временски третман	концентрација <i>JA</i> (μM)	IC_{50} ($mM RA g^{-1} DW$)					
		<i>DPPH</i> *			<i>ABTS</i> * ⁺		
1 дан	0	1,02 бв	±	0,11	0,65 ГД	±	0,09
	100	1,09 бв	±	0,22	0,52 ВГ	±	0,07
	200	0,90 аб	±	0,10	0,59 Г	±	0,05
2 дана	0	1,63 г	±	0,17	0,80 Д	±	0,10
	100	0,75 аб	±	0,05	0,29 А	±	0,05
	200	0,98 абв	±	0,16	0,50 БВГ	±	0,07
14 дана	0	1,30 вг	±	0,08	0,65 ГД	±	0,04
	100	0,62 а	±	0,03	0,34 АБВ	±	0,05
	200	0,62 а	±	0,03	0,31 АБ	±	0,01

Биљке које су биле на опоравку након третмана *JA* имале су мању антиоксидативну активност од биљака под директним утицајем *JA*, што је потврђено помоћу оба теста (Табеле 23 и 24).

Највиша антиоксидативна активност забележена је у кореновима биљака које су претходно два дана биле изложене концентрацији од 200 μM *JA* (0,38 $mM ERA g^{-1} DW$ односно 0,21 $mM ERA g^{-1} DW$; Табела 25). Коренови на свим третманима имали су и до 3 пута вишу антиоксидативну активност од изданака.

Табела 24 Антиоксидативна активност метанолних екстраката изданака након опоравка на МС подлози са 0,1 М сахарозом без хормона у трајању од 14 дана. Резултати су изражени као средње IC_{50} вредности ($n = 5 \pm SE$). Статистички значајну разлику на нивоу значајности $p \leq 0,05$ не показују вредности означене истим словом.

временски третман	концентрација JA (μM)	IC_{50} (mM RA g^{-1} g DW)					
		DPPH*			ABTS*+		
1 дан	0	1,40 бв	±	0,19	0,92 ВГ	±	0,15
	100	1,97 Г	±	0,06	1,22 Г	±	0,00
	200	0,94 а	±	0,08	0,61 АБ	±	0,05
2 дана	0	1,11 аб	±	0,11	0,63 АБ	±	0,05
	100	1,20 абв	±	0,13	0,50 А	±	0,05
	200	0,82 а	±	0,09	0,59 АБ	±	0,09
14 дана	0	1,43 бв	±	0,14	0,79 АБВ	±	0,07
	100	1,61 вг	±	0,10	0,89 БВГ	±	0,20
	200	0,72 а	±	0,04	0,48 А	±	0,06

Табела 25 Антиоксидативна активност метанолних екстраката коренова након опоравка на МС подлози са 0,1 М сахарозом без хормона у трајању од 14 дана. Резултати су изражени као средње IC_{50} вредности ($n = 2 \pm SE$). Статистички значајну разлику на нивоу значајности $p \leq 0,05$ не показују вредности означене истим словом.

временски третман	концентрација JA (μM)	IC_{50} (mM RA g^{-1} DW)					
		DPPH*			ABTS*+		
1 дан	0	0,46 а	±	0,01	0,28 АБ	±	0,00
	100	0,63 а	±	0,04	0,35 Б	±	0,00
	200	0,58 а	±	0,06	0,28 АБ	±	0,01
2 дана	0	1,05 б	±	0,11	0,59 В	±	0,05
	100	0,61 а	±	0,03	0,35 Б	±	0,01
	200	0,38 а	±	0,03	0,21 А	±	0,01
14 дана	0	0,66 а	±	0,07	0,34 Б	±	0,01
	100	0,67 а	±	0,02	0,39 Б	±	0,01
	200	--	±		--	±	

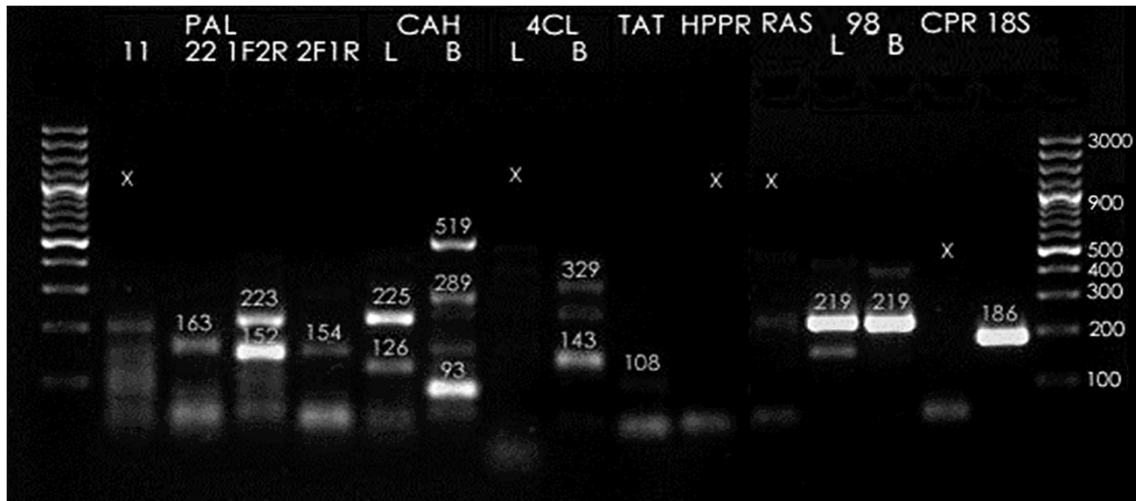
4.6. Оптимизација *PCR* протокола са прајмерима за *qPCR*

У циљу идентификације гена који учествују у биосинтетском путу рузмаринске киселине, дизајнирани су прајмери за амплификацију осам гена идентификованих у овом биосинтетском путу код биљака *Coleus blumei* **Lamiaceae** (Petersen & Simmonds, 2003). Пошто врста *R. umbellata* до сада није анализирана на молекуларном нивоу, тако да не постоје познате генске секвенце, за дизајн прајмера коришћене су секвенце хомологих гена из врста **Boraginaceae**, **Lamiaceae** и других фамилија (Табела 4). Иако су прајмери дизајнирани у регионима који су мање или више конзервисани код различитих врста, они су само делимично одговарали секвенцама гена *R. umbellata*, па је било неопходно оптимизовати *PCR* протокол за сваки од њих.

Из биљака гајених на сахарози концентрације 0,1 М изолована је тотална РНК. Након реверзне транскрипције добијена је једноланчана *cDNA* која је служила као матрица за проверу ефикасности дизајнираних прајмера и оптимизацију *PCR* протокола.

Амплификација свих комбинација дизајнираних прајмера (Табела 5) урађена је на температури спаривања (*T_a*) од 53°C. Анализом резултата утврђено је да је дужина ампликона добијених коришћењем прајмера *C98AL*, *PAL11* и *4CL Lam* различита од очекиване (Табела 5) и да постоје неспецифичне, додатне траке слабијег интензитета. Прајмери за *TAT*, *HPPR* и *RAS* су давали по једну неспецифичну траку врло слабог интензитета и ампликоне знатно мање дужине од очекиваних (Слика 63).

Оптимизација амплификације са прајмерима који су давали јаке траке (*PAL22*, *PAL12*, *PAL21*, *CAHL*, *CAHB*, *4CLB* и *C98AL*), блиске очекиваној величини, вршена је при различитим температурама спаривања 53,4; 55 и 57,1°C (Слика 64). Специфична амплификација постигнута је на температури 55°C за *98B (CYP98AB)*, односно на 57°C за прајмере *4CLB* и *CAHB* (Слика 64).



Слика 63 PCR анализа амплификације *cDNA* гена из пута синтезе рузмариנסке киселине (ознаке прајмера као у **Табели 5**), 18S представља контролу (рибозомску РНК), са **x** је означено одсуство амплификације. Бројеви изнад трака означавају добијене дужине ампликона. Ознаке код прајмера за *PAL* -11, 22, *1F2R* и *2F1R* означавају комбинације 4 дизајнирана прајмера [*F* – (*forward*) директни прајмер; *R*– (*reverse*) супротни прајмер]. *L* – прајмери добијени на основу консезнусних секвенци из **Lamiaceae**; *B* - прајмери добијени на основу консезнусних секвенци из **Boraginaceae**. Коришћени су маркери широког опсега (*High range ladder*).



Слика 64 PCR анализа амплификације гена на различитим температурама везивања (ознаке прајмера као у **Табели 5**) Бројеви 53,4, 55 и 57 означавају различите *Ta*. Ознаке *PAL22*, *PAL12* и *PAL21* указују да су 4 дизајнирана прајмера коришћена у свим комбинацијама. *CAHL* – прајмери добијени на основу консезнусних секвенци из **Lamiaceae**; *CAHB* - прајмери добијени на основу консезнусних секвенци из **Boraginaceae**. 98B- прајмер означен као *CYP98AB*. Коришћени су маркери широког опсега (*High range ladder*).

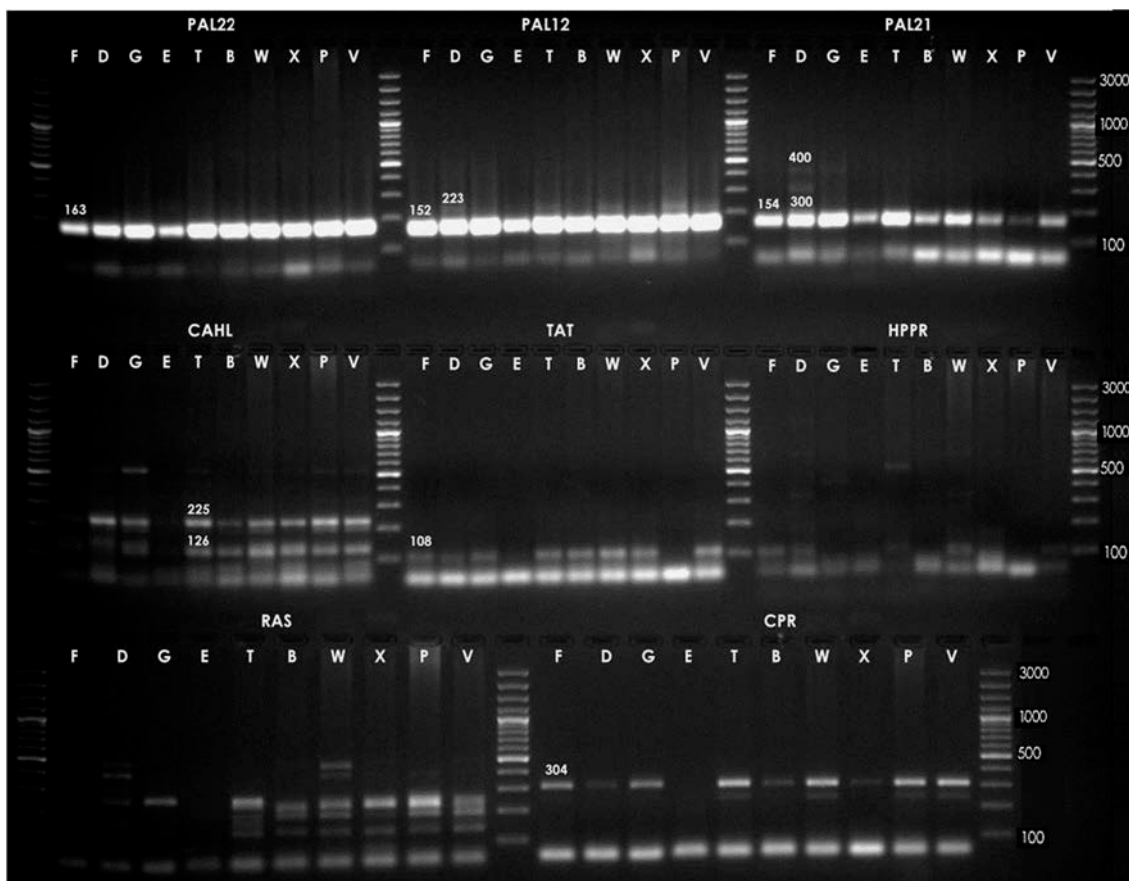
На температури од 55°C већина испитиваних прајмера даје ампликоне одговарајуће дужине и интензитета амплификације, али даје и додатне траке. Искључивање додатних трака покушано је у следећем кораку, додавањем адитива који смањују постојање евентуалних нечистоћа и настајање секундарних структура, снижавају температуру спаривања и повећавају специфичност амплификације. Адитиви су коришћени у *PCR* реакцијама и за прајмере за које није оптимизована *Ta*. Додавани су следећи адитиви: формамид (*F*), *DMSO* (*D*), глицерол (*G*), етилен гликол (*E*), трехалоза (*T*), *BSA* (говеђи албумински серум - *B*), *Tween-20* (*W*), *Triton X-100** (*X*) и *Enhancer Solution* (*P*).

Анализом добијених амликоне утврђено је да прајмери за *TAT*, *HPPR* и *RAS* који амплификују гене за тирозин трансминазу, хидроксипируват редуктазу и розмаринат синтазу, не дају специфичну амплификацију ни у једној од испробаних комбинација температуре и адитива, па су искључени из даљих експеримената (**Слика 65**).

Прајмери *PAL22* и *CPR* су специфичну амплификацију имали уз додатак глицерола, који најбоље искључује појаву неспецифичних трака код ових прајмера.

Оптимизацијом *PCR* протокола показана је експресија за три гена из фенилаланинске гране, а то су гени за фенилаланин амонијум-лијазу - *PAL*, трансцинамат 4 монооксигеназу - *САН*, 4-кумарат-*CoA* лигазу (*4CL*) и два гена која су одговорна за коначни изглед и функционалност *РА*, гени за цитохром *P450* зависна монооксигеназу (*CYP98A*) и *NADPH*:цитохром *P450* редуктазу (*CPR*).

Табела 26.



Слика 65 PCR анализа амплификације гена уз додатак адитива: формамид (*F*) *DMSO* (*D*), глицерол (*G*), етилен гликол (*E*), трехалоза (*T*), *BSA* (говеђи албумински серум) (*B*), *Tween-20* (*W*), *Triton X-100** (*X*), *Enhancer Solution* (*P*) и као контрола вода (*V*). (ознаке прајмера као у **Табели 5**), (*100 bp ladder*).

Табела 26 Прајмери коришћени за изолацију гена из пута биосинтезе *RA* са резултатима оптимизације. Консензусна секвенца - добијена помоћу више хомологих гена претежно у конзервисаним регионима (на основу секвенци из **Lamiaceae** (*Lam*) и из **Boraginaceae** (*Bor*). Секвенце за *CYP98* су преузете директно из *GenBank*; *F* – (*forward*) директни прајмер; *R* - (*reverse*) супротни прајмер; *Ta* – оптимизована температуре топљења; Ампликон (*bp*) – добијени број базних парова; *X* – одсуство амплификације.

Ензим	Консензусна секвенца	Прајмер	Ампликон (<i>bp</i>)	Адитив	<i>Ta</i> (°C)
<i>PAL</i> Фенилаланин амонијум-лијаза (EC 4.3.1.24)	<i>PAL 1</i>	<i>PAL1F</i>	x		
		<i>PAL1R</i>			
<i>PAL</i> Фенилаланин амонијум-лијаза (EC 4.3.1.24)	<i>PAL 2</i>	<i>PAL2F</i>	163	глицерол	55
		<i>PAL2R</i>			
<i>CYP73-CAH</i> Транс-цинамат 4 монооксигеназа (EC 1.14.13.11) Lamiaceae	<i>CAH Lam</i>	<i>CAH1F</i>	225		
		<i>CAH1R</i>			
<i>CYP73-CAH</i> Транс-цинамат 4 монооксигеназа (EC 1.14.13.11) Boraginaceae	<i>CAH Bor</i>	<i>CAH2F</i>	519		57
		<i>CAH2R</i>			
<i>4CL</i> 4-кумарат - <i>CoA</i> лигаза (EC 6.2.1.12) Lamiaceae	<i>4CL Lam</i>	<i>4CL1F</i>	x		
		<i>4CL1R</i>			
<i>4CL</i> 4-кумарат - <i>CoA</i> лигаза (EC 6.2.1.12) Boraginaceae	<i>4CL Bor</i>	<i>4CL2F</i>	143		57
		<i>4CL2R</i>			
<i>TAT</i> Тирозин трансминаза (EC 2.6.1.5)	<i>TAT</i>	<i>TATF</i>	108		
		<i>TATR</i>			
<i>HPPR</i> Хидроксипируват редуктаза (EC 1.1.1.237)	<i>HPPR</i>	<i>HPPRF</i>	x		
		<i>HPPRR</i>			
<i>RAS</i> Розмаринат синтаза (EC 2.3.1.140)	<i>RAS</i>	<i>RASF</i>	x		
		<i>RASR</i>			
<i>CYP98A</i> Цитохром <i>P450</i> зависна монооксигеназа (EC 1.14.14.1) Lamiaceae	AJ427452	<i>C98ALF</i>	219		
		<i>C98ALR</i>			
<i>CYP98A</i> Цитохром <i>P450</i> зависна монооксигеназа (EC 1.14.14.1) Boraginaceae	AB017418	<i>C98ABF</i>	219		55
		<i>C98ABR</i>			
<i>CPR</i> <i>NADPH</i> :цитохром <i>P450</i> редуктаза (EC 1.6.2.4)	<i>CPR</i>	<i>CPRF</i>	304	глицерол	55

5 ДИСКУСИЈА

Богата и разноврсна флора Балканског полуострва обухвата 20% угрожених биљних врста од којих је 121 врста крајње угрожена (*Stevanović* и сар., 2006). Чиниоци који смањују бројност популација могу бити различити, а један од њих је и антропогени фактор. Током времена човек је мењао животну средину и интензивно користио фармацеутски важне биљке. Бројне врсте фамилије **Boraginaceae** поседују лековита својства (*Koca* и сар., 2012), а у нашој земљи 3 врсте ове фамилије су крајње угрожене (*Stevanović*, 1999). Међу њима налази се и *R. umbellata* (*Stevanović*, 1999; *Stevanović* и сар., 2006).

Последњих година најчешће коришћен начин *ex situ* заштите ретких и угрожених биљних врста је гајење биљака у *in vitro* култури ткива, чиме је омогућена производња здравог садног материјала погодног за гајење у спољашњој средини. Овом методом може се обезбедити и довољна количина квалитетног биљног материјала који се потом може користити у фундаменталним истраживањима, али и у фармацеутској и козметичкој индустрији (*Koca* и сар., 2012).

5.1. Успостављање оптималних услова за *in vitro* раст *R. umbellata*

Степен успешности регенерације биљака гајених *in vitro* зависи од развојног стадијума биљке, састава хранљиве подлоге, комбинације регулатора растења и техника које се користе у култури ткива. Најчешће коришћена подлога за гајење угрожених и фармацеутски значајних биљних врста је *Murashige u Skoog* (1962) базална подлога (*Kapai* и сар., 2010; *Rai*, 2010; *Shahzad & Saeed*, 2013). Ова подлога је коришћена и током *in vitro* пропагације *R. umbellata*.

За успешну регенерацију биљака од великог значаја је и правилан избор почетног материјала. Култура незрелих зиготских ембриона најчешће се примењује за успостављање културе врста код којих је инхибирано исклијавање семена, било да је ембрион недовољно развијен, или је резултат инкомпатибилног хибридног укрштања у циљу добијања нових сорти (*Vinterhalter & Vinterhalter*, 1996). Присуство извора угљеника (сахарозе) у одговарајућој концентрацији (2 - 4%) повећава капацитет клијања ембриона и даљи раст клијанаца (*Lin & Leung*, 2002). Семена *R. umbellata* су услед ендогеног присуства патогене гљиве

Bipolaris sorokiniana (Ljaljević Grbić и сар., 2005) слабо вијабилна и клијају у малом проценту. Како би се спречила даља инфекција и повећао проценат клијања незрели ембриони су успешно изоловани из површински стерилисаних семена и пребачени на МС подлогу са 3% сахарозом. Након две недеље ембриони су клијали у високом проценту.

За потребе даљих експеримената било је неопходно *in vitro* одгајити велики број биљака исте старости, што је постигнуто у култури изданака поступцима микропропагације. Да би индуковали што већи ниво мултипликације, било је неопходно емпиријски утврдити баланс хормона који ће сузбити појаву и раст недиференцираног калуса, а фаворизовати раст вршног и аксиларног меристема. Ово је остварено у присуству *BAP* и *IAA*. Оптимални однос хормона за мултипликацију изданака *R. umbellata* био је 1 mg l^{-1} *BAP* и $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ *IAA*. Иста комбинација хормона коришћена је и приликом мултипликације дикотиледоних биљака као што су *Primula scotica* (Benson и сар., 2000), *Carlina acaulis* (Grubišić и сар., 2004), *Nepeta rtanjensis* (Mišić и сар., 2005b), *Harpagophytum procumbens* (Jain и сар., 2009), *Eryngium planum* (Kikowska и сар., 2012) и др.

5.1.1. Сахароза је најбољи извор угљеника за *in vitro* раст *R. umbellata*

Због редуковане фотосинтетске активности биљака гајених *in vitro*, угљени хидрати представљају неопходне компоненте подлоге. Hazarika и сар. (2000) су запазили линеарни пораст биохемијских конституената, као што су редукујући шећери, скроб и концентрација хлорофила, приликом додавања сахарозе у подлогу. *In vitro* растење и развиће је под значајним утицајем типа и концентрације примењених шећера (Beena и сар., 2013; Cuenca & Vieitez, 2000; Harada & Murai, 1996; Leva и сар., 2013; Mišić и сар., 2005b; Romano и сар., 1995; Welander и сар., 1985; Welander & Pawlicki, 1994; Yaseen и сар., 2012; Yu & Reed, 1993). Сматра се да је за оптималну мултипликацију и раст већине биљних врста оптимална концентрација сахарозе 2 - 4% (George и сар., 2008). У култури *Eclipta alba* (Dhaka & Kothari, 2005; Husain & Anis, 2006) и *Quercus suber* (Belaizi & Voxus, 1995) 3% сахароза је најефикаснији извор угљеника за раст изданка и мултипликацију. Применом глукозе успоставља се бољи раст и проценат ожиљавања изданака *Nepeta rtanjensis* (Mišić и сар., 2005a), као и раст култура

неких дрвенастих биљака из рода *Prunus* (Bozena & Szczerba, 1991), *Corylus* (Yu & Reed, 1993) и *Quercus* (Belaizi & Voxus, 1995). Највећи раст изданака, проценат ожиљавања и дужина коренова *Physocarpus opulifolius* постижу се на подлози са 3% фруктозом (Iczuk и сар., 2013). У поређењу са сахарозом, глукоза и фруктоза су бољи извори угљених хидрата за раст култура *Fagus sylvatica*. и *F. orientalis* (Cuena & Vieitez, 2000). *In vitro* раст биљака *R. umbellata* зависи како од врсте, тако и од концентрације примењеног шећера. Експлантати образују највише листова у присуству 0,3 М глукозе. Најдужи листови се образују на подлози са 0,1 М сахарозом. На истој подлози забележена је и највећа продукција свеже масе. Оптимална концентрација фруктозе за све посматране параметре раста износила је 0,06 М.

Угљени хидрати не представљају само извор енергије за раст биљака, они су и регулаторни сигнални молекули који контролишу бројне процесе развића биљака као што су вегетативно растење, цветање, плодоношење и формирање семена (Gupta & Kaur, 2005; Koch, 1996; Rolland и сар., 2006; Welandar & Pawlicki, 1994; Yaseen и сар., 2012). Регулација метаболичких процеса, раст и развиће под утицајем угљених хидрата праћено је експресијом гена који детерминишу одговарајуће ензиме. Улога угљених хидрата током деобе и диференцијације ћелија је у тесној вези са њиховим утицајем на метаболизам и развиће (Rolland и сар., 2006), а капацитет биљног ткива да користи специфичне угљене хидрате зависи од способности апсорпције и даљег метаболичког коришћења (Mezzetti и сар., 1991). Шећери су и осмотикуми који регулишу усвајање осталих конституената подлоге (*de Paiva Neto & Otoni*, 2003). Судаћи по односу суве и свеже масе розета, концентрације угљених хидрата изнад 0,1 М индукују осмотски стрес код биљака *R. umbellata*. У експериментима са *Phoenix dactylifera* (Al-Khateeb, 2008) и *Physocarpus opulifolius* (Iczuk и сар., 2013) такође је примећен пораст суве масе биљака са повећањем концентрације шећера у подлози. Највише концентрације угљених хидрата у подлози инхибирале су све праћене параметре раста *R. umbellata*. На вишим концентрацијама шећери могу да буду пребачени у биљна ткива (Oliveira и сар., 2002; Stanzel и сар., 1988) и тада биљке троше више енергије за детоксификацију огромне количине приспелог шећера, а мање за раст (Mišić и сар., 2005a). Иако су глукоза и фруктоза високо

интерконвертибилне у гликолизи, са сличним молекулским структурама, многа биљна ткива реагују различито током процеса усвајања угљених хидрата и каснијег раста (Krook и сар., 2000).

Ожиљавање је сложен процес који се може поделити у две фазе. Прву фазу чине молекуларни и биохемијски догађаји који индукују појаву нових коренова. Током ове фазе нема видљивих морфолошких промена. Друга фаза се састоји од интензивних ћелијских деоба током којих се организују ћелијски меристеми и формирају примордије, након чега следи издуживање и видљиви раст корена (Fett-Neto и сар., 2001). Ожиљавање контролишу бројни средински фактори, а у култури *in vitro* образовање нових коренова и њихов раст регулисани су минералним саставом подлоге, присуством регулатора растења и садржајем одређеног шећера као извора угљеника (Calamar & De Klerk, 2002). Код биљака које расту на подлози без шећера често не долази до формирања коренова (Faria и сар., 2004; Kozai, 1991; Mitra и сар., 1998). *R. umbellata* у природним условима поседује осовински корен који се не образује у култури *in vitro*. Уместо њега у основи експлантата формирају се танки адвентивни коренови који су врло осетљиви, крти и без бочног гранања. Најефикасније ожиљавање (65%) уочено је на подлози са 0,1 М сахарозе, док су подлоге са глукозом и фруктозом биле мање ефикасне. На истој подлози образовало се и највише најдужих коренова. Спонтано ожиљавање без хормона, а у присуству 3% сахарозе, забележено је код великог броја биљних врста, као што су *Thymus vulgaris* (Lê, 1989; Ozudogru и сар., 2011), *S. milthiorrhiza* (Morimoto и сар., 1994), *Thymus piperilla* (Stahl-Biskup & Sáez, 2002), *Salix caprea* (Naujoks, 2007), *Thymus satureioides* (Aicha и сар., 2013) итд. Током ожиљавања експлантата *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus globulus* (Corrêa и сар., 2005), *Prunus persica* x *P. amygdalus* (Fotopoulos & Sotiropoulos, 2004) и *Quercus suber* (Romano и сар., 1995), показано је да је глукоза ефикаснија од сахарозе.

Експлантати *R. umbellata* који су расли у присуству ВАР и IAA на подлогама за мултипликацију нису образовали коренове. У култури изданака *Salvia brachyodon* такође је примећено одсуство коренова када су у подлози за гајење били присутни ауксини и цитокинини у датом односу (Mišić и сар., 2006).

5.1.2. GA_3 стимулише издуживање розетастих биљака *R. umbellata*

Гиберелини имају важну улогу у регулацији процеса клијања семена, издуживања хипокотила, издуживања стабла, раста листова, иницијације цветања, повећања броја и величине цветова (Yamaguchi, 2008). Ова група фитохормона контролише правац ћелијског раста и оријентацију целулозних микрофибрила (Matsukura и сар., 1998). Неразјашњено је да ли гиберелини контролишу издуживање стабла и посредно утичу на цветање, или контролишу оба процеса независно (Grubišić и сар., 2004; Mitrović и сар., 2000).

У култури изданака *Helianthus annuus L.* и *Eclipta alba (L.) Hassk* при концентрацијама од 0,2 - 0,5 mg l⁻¹ GA_3 стимулише издуживање изданака и спречава хиперхидричност култура. Више концентрације овог хормона условљавају развој танких и дугачких изданака са мало механичких елемената, што доводи до превременог цветања биљака (Dhaka & Kothari, 2002; Dhaka & Kothari, 2005). GA_3 при нижим концентрацијама стимулише цветање (Mahesh & Jeyachandran, 2012), издуживање стабла и увећање броја интернодија розетастих (Grubišić и сар., 2004; Misra и сар., 2009) и патуљастих биљака (Matsukura и сар., 1998; Wheeler & Humphries, 1964), док при вишим концентрацијама инхибира дате процесе. У нашим експериментима GA_3 је била присутна у подлози током 4 и 6 недеља и сразмерно примењеној концентрацији и времену деловања доводила до увећања броја листова и њиховог издуживања (повећање биомасе), као и до раста стабла, тако што је индуковала издуживање интернодија. Након шест недеља третмана није примећено формирање карактеристичних задебљалих и издужених цветних изданака.

У експериментима где су коришћени инхибитори биосинтезе гибберелина показано је да GA_3 непосредно инхибира ожиљавање експлантата *Vigna radiata* (Bonga & Durzan, 1982; Hackett, 1988). Међутим, експлантати *Quercus inthaburensis* изоловани са биљака претходно третираних GA_3 ожиљавали су се у већем проценту у односу на контролну групу експлантата (Eshed и сар., 1996). Исто тако су резнице вишње, одсечене са изданака претходно третираних GA_3 , расле и боље се ожиљавале од резница узетих са нетретираних биљака. Ford и сар. (2002) су претпоставили да GA_3 индукује краткотрајно враћање на јувенилну фазу, тј. да доводи до рејувенилизације, стимулишући биосинтезу IAA и њен

поларни транспорт, што за последицу има повећање раста и процента ожиљених изданака. Гајење биљака *R. umbellata* на растућим концентрацијама GA_3 статистички значајно не повећава проценат ожиљавања и број коренова по ожиљеном експлантату. Једина разлика између третираних биљака и контролне групе огледала се у бржем издуживању новоформираних коренова на подлози са GA_3 .

5.3.1. Ниже концентрације *JA* стимулишу раст и ожиљавање биљака *R. umbellata*

Јасмонати представљају значајне компоненте сигналних путева који регулишу експресију гена одговорних за одбрану биљака од стреса (Koda, 1997; Chehab & Braam, 2012). Осим тога, *JA* и њен метил-естар (*MeJA*) инхибирају деобу и издуживање ћелија (*Ueda* и сар., 1995), а поспешују њихов раст (*De Geyter* и сар., 2012). *JA* регулише деобе и смер раста ћелија што доводи до формирања коначног облика ткива и органа (Koda, 1997). Прва испитивања могућег дејства *JA* током растења и развића односила су се на ефекат јасмоната на процесе туберизације изданака кромпира и јерусалимске артичоке, туберизације коренова слатког кромпира, формирање луковица белог и црног лука и покрете неких пузавица који су индуковани механичким стимулусом (Koda, 1997). Данас је познато да јасмонати инхибирају раст осовинског и формирање бочних коренова (*Ueda & Kato*, 1980; *Ellis* и сар., 2002). *JA* заједно са ауксинима учествују у индукцији образовања адвентивних коренова (*Gutierrez* и сар., 2012), инхибирају раст изданка током одбране од патогена (*Rymen & Sugimoto*, 2012), индукују деградацију хлорофила и убрзавају сенесценцију листова (*Breeze* и сар., 2011). Јасмонати имају вишеструки физиолошки ефекат који се огледа у модификацији метаболизма полисахарида ћелијског зида и инхибицији издуживања колеоптила *Avena sativa* L. које је индуковано *IAA*, спречавајући на тај начин синтезу нових полисахарида (*Ueda* и сар., 1995; *Miyamoto* и сар., 1997).

Ефекат *JA* у култури *in vitro* у великој мери зависи од биљне врсте и фазе развића, као и од примењене концентрације и периода изложености. Високе концентрације *JA* инхибирају раст, повећавају вакуолизацију ћелија и спречавају издуживање (*Tung* и сар., 1996). *JA* нема ефекта на формирање изданака *Pinus*

radiata D. Don. при концентрацији од 10^{-6} M, док концентрација од 10^{-5} M JA доводи до редукције броја формираних изданака, смањења дужине изданака, као и свеже и суве масе ткива (Tampre и сар., 2001). При концентрацијама од 2 - 50 nM JA стимулише развиће нодалних експлантата *Brassica oleracea* L. var. *Capitata*, а инхибира њихово образовање при вишим концентрацијама (Toro и сар., 2003). Дужа изложеност експлантата шерпета нижим концентрацијама JA (од 25 до 100 μ M) индуковала је образовање већег броја листова и пораст свеже и суве масе. Излагање експлантата највишој концентрацији JA (200 μ M) условило је пропадање листова и смањење свеже масе у односу на контролну групу. Током опоравка биљке *R. umbellata* настављају да расту, повећава се број новоформираних листова, као и свежа и сува маса, али се не превазилази инхибиторни ефекат највише концентрације JA. Утицај JA на ожиљавање *R. umbellata* праћен је тек код биљака на опоравку и запажено је да претходно примењене ниже концентрације JA стимулишу дати процес. Потпуна инхибиција формирања коренова постигнута је у присуству 200 μ M. Слични резултати су добијени и у култури коренова парадајза, где JA при нижим концентрацијама (2 - 10 nM) стимулише појаву и раст бочних коренова и има незнатан утицај на издуживање главног корена. Ниже концентрације JA стимулишу формирање отпорнијих и здравијих коренова, док више концентрације инхибирају посматрани процес (Toro и сар., 2003). Тако и MeJA инхибира раст коренова *Phaseolus coccineus*, *Allium cepa* и *Zea mays* при концентрацијама од 25 - 150 μ M (Maksymiec & Krupa, 2007).

5.2. Аклиматизација биљака *R. umbellata* на услове стакларе и поља

Физиолошке и анатомске карактеристике биљака које су расле у *in vitro* условима захтевају постепено прилагођавање условима у стакленој башти и пољу (Hazarika, 2003). Биљке у култури *in vitro* образују крупне стеме са променљивим обликом и структуром, а *in vitro* формиранли листови често не могу да расту у *ex vitro* условима и бивају замењени новим (Hazarika, 2006). Да би се што боље прилагодили повећаном интензитету светла у стаклари, биљке на почетку аклиматизације треба држати у сенци, под дифузним природним светлом током 3 - 6 дана (Pospóšilová и сар., 1999).

Додавањем угљених хидрата у подлогу током *in vitro* гајења биљака одржава се осмотски потенцијал ћелија и неопходни садржај воде. Биљке гајене са повећаним садржајем шећера у подлози формирају добро развијене листове са већом количином хранљивих материја, као и изданке и коренов систем који им омогућавају преживљавање у условима спољашње средине (Wainwright & Scrase, 1989). Сматра се да примењени шећери повећавају резерве угљених хидрата у биљкама које су гајене *in vitro*, чиме се фаворизује њихова аклиматизација и убрзава физиолошка адаптација (Yaseen и сар., 2012). Показано је да 3% сахароза повећава фотосинтетске способности и побољшава *ex vitro* преживљавање руже и *Alocasia amazonica* (Jo и сар., 2009). Биљке *R. umbellata* су током припреме за услове стакларе гајене на подлози са 3% сахарозом. Процент аклиматизованих биљака смањивао се како са аклиматизацијом на услове стакларе, тако и на услове у пољу, али критичан корак за *ex vitro* опстанак и очување ове угрожене врсте је успешно превазиђен. Аклиматизоване биљке су биле нормалног хабитуса, без морфолошких абнормалности или варијација, преживеле су зиму и цветале и плононосиле у другој години.

R. umbellata је врста која у природи насељава отворена песковита станишта. *In vitro* култивацијом ове биљке бивају изложене специфичним условима, значајно различитим од оних у природном окружењу. Успостављање оптималних услова за *in vitro* растење и развиће *R. umbellata* било је неопходно не само ради очувања постојећег генофонда, већ и за даље испитивање фитохемијских и антиоксидативних особина ове биљне врсте.

5.3.2. Садржај секундарних метаболита у биљкама *R. umbellata*

Секундарни метаболити имају велику примену у пољоприведи, фармацеутској индустрији и у индустрији хране. Преко 75% светске популације данас користи биљне препарате (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). Све је више и синтетичких лекова који садрже компоненте изоловане из биљака (Farnsworth, 1985; Payne и сар., 1988; Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). Одређени секундарни метаболити карактеристични су за дату биљну врсту, а њихова продукција је контролисана срединским условима и фазама развића биљака. Често се акумулирају само у одређеним биљним органима (трихомима).

Многи секундарни метаболити су јединствени у биљном царству и не синтетишу се у другим организмима (бактерије и животиње), а услед сложености хемијске структуре њихова синтеза у лабораторијским условима је знатно отежана (Pezzuto, 1995; Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). Управо зато биљке представљају главни, а често и једини извор многих фармацеутски важних једињења (Pezzuto, 1995; Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002). Током експлоатације и променом животне средине значајно се нарушава бројност појединих биљних врста, па је алтернативан начин продукције биљног материјала у лабораторијским, контролисаним условима, један од најважнијих начина добијања секундарних метаболита (Collinge, 1986; Dudareva и сар., 2013; Makkar 2007; Robins & Rhodes, 1988; Staniek и сар., 2013; Strazzer, 2013; Verpoorte и сар., 1999; Verpoorte и сар., 2002; Wink, 2010; Wink, 2011).

Производња секундарних метаболита коришћењем *in vitro* технологије има бројне погодности: производња не зависи од сезонских варирања и утицаја фактора средине; могуће је произвести велику количину биљног материјала без нарушавања природног станишта; *in vitro* гајење омогућава континуалну производњу датих једињења уједначеног квалитета и приноса; *in vitro* продукција фармацеутски важних секундарних метаболита у неким случајевима може бити већа него у биљкама које расту у природи, а понекад је у биореакторима могуће произвести и једињења која се у нормалним условима не могу наћи у биљкама прикупљеним у природи (Petersen & Simmonds, 2003; Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002; Ulbrich и сар., 1985; Yu и сар., 2002).

Многе потенцијално фармацеутски значајне биљне врсте нису фитохемијски окарактерисане. Управо зато трагање за новим биолошки активним једињењима и врстама које их синтетишу представља важан задатак биотехнологије (Ramachandra Rao & Ravishankar, 2002).

Према литературним подацима фитохемијске карактеристике биљака *R. umbellata* нису довољно проучене. Недавно је испитан садржај пиролизидинских алкалоида у различитим деловима биљака прикупљених на природном станишту у Делиблатској пешчари (Mandić и сар., 2013). О садржају фенолних једињења у биљкама из природе и фитохемијским карактеристикама биљака шерпета гајених у *in vitro* култури нема података. Серијом различитих аналитичких метода, као

што су *HPLC-MS* и *GC-MS*, и на основу спектралних карактеристика, фитохемијски су окарактерисане биљке *R. umbellata* из природе и биљке гајене *in vitro*.

5.3.1 Квантитативни и квалитативни садржај *PA* зависи од услова гајења *R. umbellata*

У екстрактима коренова и надземних делова биљака из природе, детектовано је присуство *PA* и фенолних киселина (*RA* и *LAB*). Засићени и незасићени пиролизидински алкалоиди (укупно 19) највише су заступљени у листовима розете биљака из природе и веома су разноврсни. У отвореним цветовима присутно је пет врста засићених (*PAS*) и три врсте незасићених (*PANS*) пиролизидинских алкалоида, од којих су линделофин и *PANS II* присутни и у кореновима. Ови резултати су слични подацима објављеним у радовима *Simić* (2007) и *Mandić* и сар. (2013). У узорцима *R. umbellata* који су сакупљени у природи једино нису детектовани линделофин-*N*-оксид, хелиосупин-*N*-оксид, 9-(+)-трахелантил-лабурнин и ехинатин. Имајући у виду да је биљни материјал прикупљан на истом локалитету, током различитих година и у различитим фенофазама, можемо да претпоставимо да су детектоване разлике у садржају *PA* резултат утицаја различитих абиотичких фактора (температура, светлост, влажност ваздуха и тип подлоге). У фитохемијском саставу других проучаваних врста рода *Rindera* (*R. austroechinata*, *R. baldschuanica*, *R. cyclodonta*, *R. echanata* and *R. oblongifolia*) такође је најзаступљенији хелиотридински тип *PA* (*Smith & Culvenor*, 1981).

Веома низак садржај *PA*, детектован у 15 пута концентрованијим узорцима, показао је да биљке *R. umbellata* гајене *in vitro* не производе незасићене токсичне *PA*, већ само засићене *PA*, и то линделофин у кореновима и 7-ангелоилхелиотридан у изданцима. Овај налаз је у складу са литературним подацима који показују да се нека једињења попут никотина, тропанских алкалоида, *PA* и многих терпеноида не производе, или се производе мање ефикасно у *in vitro* култури (*Hartmann*, 2007). *PA* могу да индукују оштећења јетре и тровање људи након неконтролисаног конзумирања зачинских и лековитих биљака које их продукују (*Chauvin* и сар., 1994; *Huxtable*, 1980; *Rasenack* и

сар., 2003; *Sperl* и сар., 1995). Осим тога, *РА* су често одговорни и за тровање домаћих животиња (кокошака, патака, коња, крава и оваца; *Fletcher* и сар., 2008; *Knight* и сар., 1984; *Nobre* и сар., 2005; *Pass* и сар., 1979). *РА* се тешко метаболишу, могу се наћи у млеку, јајима, месу и меду (*Coulombe*, 2003), а након дужег конзумирања ових контаминираних производа честа је појава тумора (*Fu* и сар., 2004; *Dreger* и сар., 2009).

Због смањеног садржаја *РА*, посебно токсичних облика *РА* у *in vitro* гајеним биљкама *R. umbellata*, ова метода је погодна за продукцију осталих фармаколошки значајних секундарних метаболита.

5.3.2. *R. umbellata* - потенцијални извор *РА* и *LAB*

Фенолна једињења су код биљака нарочито присутна у листовима, цветовима и изданцима, а флавоноида има и у плодовима (*Larson*, 1988). Анализом метанолских екстраката појединих делова биљака *R. umbellata* које су сакупљене у Делиблатској пешчари показано је да је дистрибуција укупних фенолних једињења иста у надземним и подземним деловима биљака. Од фенолних једињења, осим флавоноида, идентификоване су и фенолне киселине *РА* и *LAB*. У надземним деловима *R. umbellata* укупни садржај *РА* ($0,84 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) био је виши од садржаја *LAB* ($0,07 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$), за разлику од корена у коме је садржај *LAB* ($1,62 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$) вишеструко превазилазио количину детектоване *РА* ($0,18 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$). Сличан фитохемијски састав описан је и за сродну врсту *Rindera graeca*, у чијим узорцима је поред *РА* и *LAB* детектован шиконин (*Syklowska-Baranek* и сар., 2012).

Откриће да изданци, коренови, калуси и ћелијске суспензије, као и трансформисани коренови различитих биљних врста, често производе *РА* у знатно већим количинама него биљке из природе условило је развој *in vitro* метода и дефинисање оптималних услова који би се могли искористити у будућој комерцијалној производњи (*Syklowska-Baranek* и сар., 2012; *Santos-Gomes* и сар., 2002; *Kikowska* и сар., 2012; *Karam* и сар., 2003; *Petersen*, 2013). За производњу *РА* најчешће се користе ћелијске културе *Coleus blumei* (*Bauer* и сар., 2009; *Gertlowski & Petersen*, 1993; *Petersen* и сар., 1995; *Petersen* и сар., 2009; *Razzaque & Ellis*, 1977; *Szabo* и сар., 1999; *Ulbrich* и сар., 1985) у

којима је удео *RA* 20% суве масе (*Razzaque & Ellis*, 1977), док култура трансгених коренова *Salvia miltiorriza* представља до сада најбоље дефинисани систем за производњу *LAB* (*Chen* и сар., 1999; *Xiao* и сар., 2009).

Покушаји трансформације и успостављање *in vitro* културе коренова *R. umbellata* били су безуспешни (подаци нису приказани). Зато су ради повећања акумулације *RA* и *LAB* у култури изданака *R. umbellata*, тестирани ефекти угљених хидрата (сахарозе, фруктозе и глукозе), гибберелина и јасмонске киселине.

Ниво продукције секундарних метаболита зависи од доступних угљених хидрата присутних у подлози (*Gertlowski & Petersen* 1993). Високе концентрације угљених хидрата могу довести до промене метаболизма ћелија, индукујући пораст синтезе секундарних метаболита углавном преко фенилпропаноидног пута (*Hippolyte* 2000; *DiCosmo & Misawa*, 1995). Фенолна једињења и угљени хидрати имају међусобно повезане метаболичке путеве: пентозно-фосфатни пут је део пута синтезе фенолних једињења и угљени хидрати повећавају ниво фенилаланин амонијум-лиазе (PAL; Е.С. 4.3.1.5), једног од кључних ензима у биосинтези фенолних једињења (*Camm & Towers*, 1973; *Cramer* и сар., 1989; *Dixon & Paiva*, 1995; *Gómez Vásquez* и сар., 2004). У култури ћелија *Coleus blumei* повећање концентрације сахарозе са 2,5% на 7,5% довело је до повећања продукције *RA* са 0,8 g l⁻¹ на 3,3 g l⁻¹ (*Misawa*, 1985). Слични резултати добијени су приликом тестирања културе суспензија ћелија *Lavandula vera* у којој је садржај *RA* вишеструко повећан у присуству 7% сахарозе (*Ilieva & Pavlov*, 1997). Највећи садржај *RA* измерен је у узорцима *R. umbellata* који су гајени на третману са сахарозом највиших концентрација (0,3 M и 1 M), при чему су ове концентрације угљених хидрата биле инхибиторне за раст и продукцију биомасе. Повећање продукције *RA* у калусима *E. planum* је обрнуто сразмерна порасту биомасе (*Kikowska* и сар., 2012), што је случај и у култури *S. officinalis* (*Santos-Gomes* и сар., 2002). Високе концентрације угљених хидрата представљају стрес за биљке, тј. индукују промене у метаболизму ћелије и инхибирају раст, али истовремено стимулишу продукцију секундарних метаболита, нарочито оних једињења која настају у фенилпропаноидном путу (*Hippolyte*, 2000; *Misawa*, 1994). *Rateb* и сар. (2007) су, варирајући услове *in vitro* раста *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip, закључили да се, уз додатак глукозе или фруктозе и регулатора растења (*BAP* и

НАА по $0,5 \text{ mg l}^{-1}$) продукција партенолида значајно повећава, уколико се концентрација минералних материја у основној подлози смањи на половину почетне вредности. Повећањем концентрације сахарозе на 6 % и смањењем доступних нутријената у ћелијској суспензији *Coleus blumei* индукована је повећана акумулација RA. Претпоставља се да продукција RA у биљкама почиње онда када хранљиве материје постану недовољне за раст, па се путеви синтезе преусмеравају са путева који стимулишу раст на оне биосинтетске путеве који омогућавају продукцију одбрамбених секундарних метаболита. (Petersen и сар., 1995). У изданцима *R. umbellata* измерен је вишеструко мањи садржај LAB него у кореновима биљака гајених 4 недеље на различитим шећерима. Највиши садржај LAB ($2,06 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$) измерен је у узорцима коренова на третману са 0,3 M фруктозом, на којој је детектована и најнижа продукција биомасе.

Утицај гиберелина на синтезу секундарних метаболита је углавном праћен током гајења биљака *Catharanthus roseus* (Jaleel и сар., 2009; Abbasi и сар., 2012) и *Mentha spicata* (Singh и сар., 2000). Показано је да садржај алкалоида у биљкама расте са повећањем концентрације гиберелина којим су биљке биле претходно третиране (Misra и сар., 2009; Singh и сар., 2000; Srivastava & Srivastava, 2007). Синтеза и акумулација RA и LAB под утицајем различитих концентрација GA_3 до сада није праћена код биљака. У нашим експериментима је са повећањем концентрације GA_3 и дужине гајења на датој подлози примећен пад у садржају укупних флавоноида, RA и LAB и поред повећаног садржаја укупних фенолних једињења. И у овом експерименту је садржај секундарних метаболита био обрнуто сразмеран расту биљака *R. umbellata*.

Елицитори и, најпознатији међу њима, JA и MeJA, често се користе у култури *in vitro* ради повећања продукције бројних секундарних метаболита као што су изофлавоноиди (Korsangruang и сар., 2010), хиперицини и хиперфорин (Liu и сар., 2007; Coste и сар., 2011), фенилпропаноиди (Gadzovska и сар., 2007), центелозиди (Bonfill и сар., 2011), сапонини (Kim и сар., 2004; Yu и сар., 2002), деривати кумарина (Rhee и сар., 2010). Јасмонати индукују и продукцију RA у суспензији ћелија *Lithospermum erythrorhizon* (Mizukami и сар., 1993; Tsuruga и сар., 2006), *Coleus blumei* (Szabo и сар., 1999), *Lavandula vera* (Georgiev и сар., 2007), *Mentha piperita* (Krzyzanowska и сар., 2012), као и синтезу LAB и RA у

култури трансгених коренова *Salvia miltiorrhiza* (Xiao и сар., 2009). У култури коренова жен-шена *JA* и *MeJA* индукују повећање садржаја гинсенозида, али истовремено успоравају њихов раст (Kim, 2002; Kim и сар., 2007). Ради постизања што веће продукције гинсенозида, аутори су успоставили двофазни систем: гајени су коренови и индукован је њихов раст, а потом су додавани елицитори и праћена је акумулација гинсенозида. Да би се избегао потенцијални инхибиторни ефекат *JA* на раст култура *R. umbellata* и што тачније дефинисала оптимална дужина третмана и одговарајућа концентрација *JA*, у нашим експериментима успостављен је трофазни систем. Током прве фазе биљке су расле на хранљивој подлози у одсуству фитохормона. Друга фаза је обухватала третман *JA*. Садржај *LAB* и *RA* мерен је непосредно после друге и треће фазе када су биљке, након третмана *JA*, поново гајене на подлози без хормона. Утврђено је да *JA* повећава продукцију испитиваних једињења, као и да продукција зависи од концентрације датог хормона и од дужине трајања третмана. Највиши садржај *RA* ($1,90 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$) имали су изданци биљака гајени 2 дана на концентрацији од $100 \mu\text{M JA}$. Продукција *LAB* у изданцима *R. umbellata* расла је сразмерно примењеној концентрацији *JA* и дужини изложености њеном утицају до максималне вредности од $0,76 \text{ mg ERA g}^{-1} \text{ DW}$ при концентрацији од $200 \mu\text{M JA}$ у трајању од 14 дана. Током фазе опоравка на изданцима се образују адвентивни коренови. Анализом садржаја фенолних киселина у кореновима и изданцима показано је да се садржај *RA* значајно не мења након фазе опоравка, тј. прерасподељује се између листова и новообразованих коренова. Насупрот томе, садржај *LAB* се смањује у листовима, а повећава у кореновима. Непосредно након третмана *JA* количина *LAB* у изданцима била је неколико пута мања од укупне количине *LAB* измерене у кореновима и изданцима старијих биљака *R. umbellata*. Имајући у виду да се након опоравка на подлози без хормона не уочава статистички значајна разлика у продукцији фенолних киселина између контролне групе и третираних изданака, може се закључити да је ефекат *JA* краткотрајан и да се губи током накнадне култивације. Повећање садржаја *LAB* током времена на рачун садржаја *RA* указује на могућност да је *RA* прекурсор у биосинтези *LAB*. Xiao и сар. (2010) претпоставили су, на основу промене садржаја *RA* и *LAB* и експресије кључних гена који контролишу биосинтезу *RA* у култури трансгених коренова *Salvia*

miltiorrhiza, да се током биосинтезе *LAB* дејством још неидентификованог биосинтетског ензима из кафеинске и ружмаринске киселине образује интермедијер који у следећем кораку реагује са 3,4-дихидроксибензилмлечном киселином и директном естерификацијом образује *LAB*.

Даље побољшање техника *in vitro* гајења *R. umbellata*, оптимизацијом састава минералних соли, комбинације угљених хидрата, хормона, као и додавањем прекурсора биосинтезе, као и дизајн одговарајућих генских конструката за добијање трансгених коренова и оптимизација услова за њихов раст, као и успостављање оптималних услова за продукцију *RA* и *LAB* у биореакторима, највероватније би обезбедило довољне количине материјала неходне за производњу и изоловање датих једињења. На овај начин добио би се биљни материјал без присуства токсичних *PA*, који се иначе синтетишу у биљкама које расту на отвореном станишту.

5.3. Антиоксидативна активност *R. umbellata*

Природни антиоксиданси су једињења која се све више користе у прехранбеној и фармацеутској индустрији (*Krishnaiah* и сар., 2011) Истраживања су показала да ароматичне биљке које садрже велику количину фенолних једињења представљају богат извор природних антиоксиданаса (*Larson*, 1995; *Matkowski*, 2008; *Rice-Evans* и сар., 1997). Антиоксидативни секундарни метаболити из *in vitro* гајених биљака могу се поделити на три класе: полифеноле (антоцијанини, флавоноиди, флавоноли, *RA* и *LAB*), изопреноиде (каротеноиди, ликопен, монотерпени) и остале структуре (витамин Е, беталаини, витамин *B₆*, аскорбат, редуковани глутатион, *SOD*, *CAT*, селен и магнезијум; *Angaji* и сар., 2012). Антиоксидативна својства фенолних једињења огледају се у способности уклањања слободних радикала и хелирању метала спречавањем одвијања Фентонове реакције и липидне пероксидације (*Potter*, 2005; *Soobrattee*, 2005). Захваљујући овим карактеристикама, фенолна једињења поседују антиканцерогену, антимуtagenу, антибактеријску, анти-инфламаторну, антивиралну, антиалергијску, хепатопротективну и вазодилаторну улогу (*Bravo*, 1998; *Middleton* и сар., 2000; *Pinchuk* и сар., 2012). Кафеинска киселина показује бољи капацитет за хелирање метала од витамина Е (*Gülçin*, 2006), али је за њу и

ферулинску киселину утврђено да при вишим концентрацијама могу да доведу до оксидативног стреса (*Maurya & Devasagayam, 2010*). Ова особина је можда заслужна за њихове антиканцерогене способности, пошто могу да индукују и апоптозу (*Azam и сар., 2004*). Флавоноиди имају важну улогу у биљној биохемији и физиологији, али могу бити и инхибитори ензима и прекурсори токсичних супстанци (*Middleton и сар., 2000*). Ова група фенолних једињења може да функционише као „помоћник“ при обликовању одбрамбених реакција биљака индукованих абиотичким или биотичким условима (*Pourcel и сар., 2013*).

Једно од најпознатијих фенолних једињења са снажном антиоксидативном активношћу је *RA* (*Chen и сар., 1999; Lu & Foo, 2002; Soobrattee, 2005*). У *in vitro* експериментима где је праћена *DPPH* активност неколико хидроксициметних киселина, показано је да *RA* у поређењу са хлорогеном, ферулинском и кафеинском киселином, поседује највишу антиоксидативну активност захваљујући највећем броју хидроксилних група (укупно 4: *ortho*-дихидробензен/катехол структура) и великом броју коњугованих двогубих веза (*Chen и сар., 1999*). Нешто касније је показано да и *LAB*, дериват *RA*, има високу антиоксидативну активност и да оба једињења штите ћелије од оксидативног стреса, цереброваскуларних сметњи, реуматоидног артритиса и канцера (*Bulgakov и сар., 2012*)

5.4.1 Садржај *RA* и *LAB* одређује ниво антиоксидативне активности *R. umbellata*

Чињеница да је измерен висок садржај укупних фенолних једињења у оквиру којих је забележен висок садржај флавоноида, *RA* и *LAB* у узорцима биљака *R. umbellata* сакупљених на природном станишту и оних гајених *in vitro*, указивала је на потенцијалну антиоксидативну активност *R. umbellata*. Резултати *DPPH* и *ABTS* тестова су показали да највишу антиоксидативну активност поседују коренови, у којима је измерен и највиши садржај укупних фенола, флавоноида и *LAB*. Антиоксидативна активност *in vitro* гајених коренова на МС подлози била је два пута виша од вредности измерене у узорцима из природе. У односу на листове, коренови су поседовали већу антиоксидативну способност и виши садржај флавоноида и *LAB*. Антиоксидативна активност узорака гајених на

различитим третманима, тј. у присуству угљених хидрата и фитохормона у великој мери је зависила од продукције фенола, посебно од количине *RA* и *LAB*. Тако су, и поред високог садржаја укупних фенола, али услед ниске количине *RA* и *LAB*, метанолски узорци коренова гајених на $10 \mu\text{M}$ GA_3 неутрализовали *DPPH*[•] и *ABTS*^{•+} радикале на нивоу контроле. Најбољи резултати у узорцима коренова постигнути су након третмана $0,3 \text{ M}$ фруктозом, где је у узорцима детектована знатно већа количина *LAB* у односу на количину *RA*. У узорцима коренова биљака које су биле на опоравку од утицаја *JA* показано је три пута више антиоксидативно дејство у односу на узорке изданака што може да се повеже са већим садржајем *LAB*. На основу приказаних резултата може се закључити да *RA* и *LAB* у највећој мери одређују ниво антиоксидативног капацитета метанолских екстраката *R. umbellata*.

5.4. Експресија гена биосинтетског пута *RA* у *R. umbellata*

Експерименти праћења експресије гена током диференцијације, морфогенезе, напада патогена, у условима стреса, при различитим третманима или у одговору на различите стимулусе, веома су важни у фундаменталним истраживањима. Ови експерименти представљају основу за идентификацију гена који учествују у неком физиолошком одговору или трансдукцијском путу, а начин индукције и експресије неког гена указује на његову функцију (Simonović, 2011).

Да би се синтеза усмерила ка одговарајућем продукту, потребно је добро познавање регулаторних механизма и одговарајућих гена који контролишу дати биосинтетски пут (Staniek и сар., 2013). У врстама фамилије **Lamiaceae** (*Salvia miltiorrhiza*, *Melissa officinalis*, *Perilla frutescens*, *Agastache rugosa*) и фамилије **Boraginaceae** (*Arnebia euchroma*, *Lithospermum erythrorhizon*) изоловани су и окарактерисани гени који контролишу кључне ензиме (*PAL*, *САН*, *4CL*, *TAT*, *HPPR*, *RAS*, *CYP98A14*, *CPR*) у биосинтези *RA*. Међутим, многе секвенце ових гена су аотиране само према сличности и без тестирања њихове каталитичке активности (Petersen, 2013). Према Petersen и сар. (1993) у ћелијској култури *Coleus blumei* пут биосинтезе *RA* започиње у два одвојена пута. У првој „грани“ настаје 4 кумароил- *CoA* конверзијом фенилаланина у присуству *PAL*, *САН* и *4CL*, док се у другој „грани“ активношћу *TAT* из *L*-тирозина формира 4- хидрокси-

фенилпируват, који се редукује помоћу *HPPR* до 4-хидроксифениллактата. На споју ове две гране налази се синтаза рузмаринске киселине (*RAS*) која врши трансфер 4-кумароил дела из 4-кумароил *Co-A* до алифатичне ОН- групе 4 хидроксифениллактата и образује 4-кумароил-4'-хидроксифениллактат. Крајњи продукт, рузмаринска киселина, настаје у заједничком путу уз активност кафеил-4'-хидроксифениллактат 3'-хидроксилазе и 4-кумароил -3',4'-дихидроксифениллактат 3- хидроксилазе (*Petersen* и сар., 2009). Новија истраживања показују да је током завршне обраде молекула 4-кумароил-4'-хидроксифениллактата укључен и ензим *CYP98A* тј. цитохром P450 зависна монооксигеназа (*Petersen*, 2013).

R. umbellata до сада није анализирана на молекуларном нивоу и за ову врсту не постоје познате генске секвенце. Зато су прајмери за амплификацију осам кључних гена, претходно идентификованих у биосинтетском путу *RA* *Coleus blumei*, дизајнирани на основу познатих секвенци хомологих гена из врста које припадају фамилијама **Lamiaceae**, **Boraginacea** и др. Иако су прајмери дизајнирани у регионима који су углавном конзервирани, они су само делимично одговарали секвенцама гена *R. umbellata*. То је био разлог неспецифичне амплификације и добијања ампликона дужина другачијих од очекиваних. Након оптимизације *PCR* протокола применом одређених адитива и варирањем температуре спаривања за сваки прајмер посебно, постигнута је специфична амплификација прајмера за *PAL*, *SAH*, *4CL*, *CYP98A*, *CPR*, тј. за три гена из фенилаланинске „гране“ и два гена која су одговорна за функционалност рузмаринске киселине. У узорцима *R. umbellata* није детектована експресија гена за *TAT*, *HPPR* и *RAS*, ензима друге „гране“ који контролишу пут конверзије *L*-тирозина. Према литературним подацима биосинтеза *RA* се у свим до сада тестираним биљним врстама одвија уз активно учешће ензима обе „гране“ (*Petersen* и сар., 2009), Помоћу радиоактивног обележавања утврђено је да се код *Mentha arvensis* и *Mentha piperita* фенилаланин уграђује у кафеинску киселину, а тирозин у 3,4 – дихидроксифенилмлечну киселину који заједно граде рузмаринску киселину (*Ellis & Towers*, 1970; *Shetty*, 2007). Претпоставља се да сличан модел биосинтезе постоји и код *Rosmarinus officinalis* (*Scarpati & Oriente*, 1958), *Coleus blumei*, *Salvia officinalis* (*Petersen & Simmonds*, 2003) и *Anchusa officinalis* (*Petersen* и сар., 1993). Наши резултати

указују на могућност да се *RA* у биљкама *R. umbellata* синтетише само преко фенилаланинског пута и да су поред идентификованих ензима и неки други ензими укључени у биосинтетски пут *RA*.

Будућа испитивања у расветљавању биосинтетског пута *RA* у биљкама *R. umbellata* би требало да се заснивају на образовању *cDNA* библиотеке и паралелном праћењу присуства међупроизвода, одговарајућих ензима и експресије циљних гена у биосинтези *RA*. С обзиром да је у култури *R. umbellata* продукција *RA*, као и *LAB* стимулирана у присуству *JA* и угљених хидрата, било би значајно утврдити и, на нивоу експресије гена, начин деловања ових регулатора растења.

6 ЗАКЉУЧЦИ

- ❖ Успешно је успостављена *in vitro* култура врсте *R. umbellata* и утврђено је да:
 - Ниже концентрације угљених хидрата стимулишу процесе растења и развића, док их највише концентрације (0,3 M и 1 M) инхибирају. Сахароза представља најбољи извор угљеника за *in vitro* раст, ожиљавање и аклиматизацију биљака *R. umbellata*.
 - Гиберелна киселина стимулише раст и издуживање биљака *R. umbellata* и значајно не утиче на ожиљавање, осим што при концентрацији од 1 μ M индукује брже издуживање новоформираних адвентивних коренова.
 - Јасмонска киселина стимулише *in vitro* раст и ожиљавање, посебно при нижим концентрацијама и на краћим третманима. Ови ефекти су израженији након опоравка. Највиша концентрација JA (200 μ M) инхибира све посматране процесе.

- ❖ Квантитативни и квалитативни садржај пиролизидинских алкалоида зависи од начина гајења, фенофазе и тестираног биљног органа. Најмање PA синтетишу биљке гајене *in vitro* у којима су детектовани само zasiћени (нетоксични) PA.

- ❖ Фенолна једињења су више присутна у листовима и корену биљака из природе него у њиховим цветовима и стаблу. У надземним деловима ових биљака укупни садржај рузмаринске киселине је виши од садржаја литоспермичне киселине Б, за разлику од корена у коме количина LAB вишеструко превазилази концентрацију детектоване RA. Сличан однос садржаја RA и LAB запажен је и у биљкама које су гајене *in vitro*, при чему количина посматраних секундарних метаболита у корену и листу зависи од третмана:
 - У изданцима гајених *in vitro* највећи садржај укупних фенола, као и флавоноида и RA измерен је при највишим концентрацијама сахарозе

(0,3 *M* и 1 *M*). Највећа концентрација *LAB* измерена је у узорцима коренова на третману са 0,3 *M* фруктозом.

- Гиберелна киселина статистички значајно не мења продукцију анализираних фенолних једињења у изданцима. У кореновима садржај укупних фенолних једињења расте, док садржај флавоноида, *RA* и *LAB* опада сразмерно повећању концентрације *GA*₃.
- Садржај укупних фенола међу којима је садржај флавоноида, *LAB* и *RA* мерен у изданцима непосредно након третмана *JA* зависи од концентрације датог хормона у подлози и од дужине трајања третмана. Највећа концентрација укупних фенола, флавоноида и *LAB* измерена је у узорцима изданака биљака гајених при концентрацији од 200 μM *JA* током 14 дана. Највиши садржај *RA* имали су изданци биљака гајени 2 дана при концентрацији од 100 μM *JA*. Обзиром да се након опоравка на подлози без хормона не уочава статистички значајна разлика у продукцији фенолних киселина између контролне групе и третираних изданака, може се закључити да је ефекат *JA* краткотрајан и да се временом губи.
- ❖ Садржај *RA* и *LAB* одређује ниво антиоксидативне активности врсте *R. umbellata*. Највећу антиоксидативну активност поседују коренови са највишим садржајем укупних фенола, флавоноида и *LAB*, као и узорци изданака гајених при највишим тестираним концентрацијама угљених хидрата (0,3 *M*) и *JA* (200 μM). Биљке сакупљене у природи производе мање секундарних метаболита и показују мању антиоксидативну активност од биљака гајених *in vitro*.
- ❖ У узорцима *R. umbellata* потврђена је експресија три специфична гена из фенилаланинске „гране“ биосинтетског пута *RA* (*PAL*, *4CL*, и *SAH*), ген за *NADPH*: цитохром *P450* редуктазу (*CPR*) и ген за цитохром *P450* зависну монооксигеназу (*CYP98A*). У овим узорцима није детектована експресија гена за *TAT*, *HPPR* и *RAS*, тј. ензима друге „гране“ који контролишу пут конверзије *L*-тирозина.

7 ЛІТЕРАТУРА

- Abbasi, B. H., Stiles, A. R., Saxena, P. K., & Liu, C.-Z. (2012): Gibberellic acid increases secondary metabolite production in *Echinacea purpurea* hairy roots. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168(7): 2057-2066.
- Aicha, N., Rachida, T. C., & Meskaoui, E. (2013): Micropropagation of *Thymus satureioides* Coss. an endangered medicinal plant of Morocco. *Journal of Agricultural Technology*, 9(2): 421-435.
- Al-Khateeb, A. (2008): Regulation of *in vitro* bud formation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khanezi by different carbon sources. *Bioresource Technology*, 99(14): 6550-6555.
- Andersen, Y. M., & Markham, K. R. 2006. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. *CRC Press LLC*: Boca Raton.
- Angaji, S. A., Mousavi, S. F., & Babapour, E. (2012): Antioxidants: A few key points. *Annals of Biological Research*, 3 (8): 3968-3977.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology*, 55: 373-399.
- Azam, S., Hadi, N., Khan, N. U., & Hadi, S. M. (2004): Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicology in vitro*, 18(5): 555-561.
- Barclay, L. R. C., Vinqvist, M., Mukai, K., Itoh, S., & Morimoto, H. (1993): Chain-breaking phenolic antioxidants: steric and electronic effects in polyalkylchromanols, tocopherol analogs, hydroquinones, and superior antioxidants of the polyalkylbenzochromanol and naphthofuran class. *The Journal of Organic Chemistry*, 58(26): 7416-7420.
- Barratt, D. P., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J., Feil, R., Simpson, C., Maule, A. J., & Smith, A. M. (2009): Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31): 13124-13129.

- Bauer, N., Kiseljak, D., & Jelaska, S. (2009): The effect of yeast extract and methyl jasmonate on rosmarinic acid accumulation in *Coleus blumei* hairy roots. *Biologia plantarum*, 53(4): 650-656.
- Beecher, G. R. (2003): Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of nutrition*, 133(10): 3248S-3254S.
- Beena, D., Rathore, T., & Rao, P. (2013): Effects of carbohydrates on *in vitro* axillary shoot initiation and multiplication of *Bambusa pallida* Munro. *Journal of Phytology*, 4(5).
- Belaizi, M., & Boxus, P. (1995): *In vitro* shoot multiplication of cork oak (*Quercus suber* L.). Influence of different carbohydrates. *Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux*, 30.
- Benson, E. E., Danaher, J. E., Pimbley, I. M., Anderson, C. T., Wake, J. E., Daley, S., & Adams, L. K. (2000): *In vitro* micropropagation of *Primula scotica*: A rare Scottish plant. *Biodiversity and Conservation*, 9(6): 711-726.
- Bhojwani, S. S., & Razdan, M. 1996. Plant tissue culture: theory and practice. Studies in plant science. *Elsevier Science & Technology*.
- Blois, M. S. (1958): Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Bömke, C., & Tudzynski, B. (2009): Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry*, 70(15–16): 1876-1893.
- Bonfill, M., Mangas, S., Moyano, E., Cusido, R. M., & Palazón, J. (2011): Production of centellosides and phytosterols in cell suspension cultures of *Centella asiatica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(1): 61-67.
- Bonga, J., & Durzan, D. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In: *Tissue culture in forestry*, Springer, The Hague: 387–412.
- Boros, B., Jakabová, S., Dörnyei, Á., Horváth, G., Pluhár, Z., Kilár, F., & Felinger, A. (2010): Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*, 1217(51): 7972-7980.
- Böttcher, C., von Roepenack-Lahaye, E., Schmidt, J., Schmotz, C., Neumann, S., Scheel, D., & Clemens, S. (2008): Metabolome analysis of biosynthetic mutants

- reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 147(4): 2107-2120.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001): Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5): 839-851.
- Bowsher, C., Steer, M., & Tobin, A. 2008. Plant biochemistry. *Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC*.
- Bozena, B., & Szczerba, J. (1991): Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. *Journal of experimental botany*, 42(7): 911-915.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1): 25-30.
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y.-s., Penfold, C. A., & Jenkins, D. (2011): High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis* leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell Online*, 23(3): 873-894.
- Brewer, M. S. (2011): Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4): 221-247.
- Buah, J. N., Kawamitsu, Y., Yonemori, S., Hayashi, M., & Murayama, S. (2000): Effects of various carbon sources and their combinations on *in vitro* growth and photosynthesis of banana plantlets. *Plant Production Science*, 3(4): 392-397.
- Bulgakov, V. P., Inyushkina, Y. V., & Fedoreyev, S. A. (2012): Rosmarinic acid and its derivatives: Biotechnology and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(3): 203-217.
- Bunke, Z., & Merkl, O. 1996. Herbarium Wolnyanum II. *Annales Historico Naturales Musei Nationalis Hungarici*: 297-324.
- Calamar, A., & De Klerk, G.-J. (2002): Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. *Plant cell, tissue and organ culture*, 70(2): 207-212.
- Camm, E. L., & Towers, G. H. N. (1973): Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry*, 12(5): 961-973.

- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., & Chandra, R. (2010): Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32(9): 1199-1205.
- Chauvin, P., Dillon, J., & Moren, A. (1994): An outbreak of *Heliotrope* food poisoning, Tadjikistan, November 1992-March 1993. *Santé (Montrouge, France)*, 4(4): 263.
- Chehab, E. W., & Braam, J. 2012. Jasmonates in plant defense responses, biocommunication of plants, G. Witzany, & F. Baluška (Eds.), Springer Berlin Heidelberg, Vol. 14: 67-88.
- Chen, H., Chen, F., Zhang, Y., & Song, J. (1999): Production of lithospermic acid B and rosmarinic acid in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Industrial Microbiology and biotechnology*, 22(3): 133-138.
- Chen, L., Lu, Y., & Zheng, S. Z. (2009): Integration effect on pharmacological component in *Salvia miltiorrhiza*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 40(3): 476-479.
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013): Plant Phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*: 1-39.
- Collin, H. A. (2001): Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 34(1): 119-134.
- Collinge, M. (1986): Ways and means to plant secondary metabolites. *Trends in Biotechnology*, 4(12): 299-301.
- Corbineau, F., & Rudnicki, R. (1988): The effects of methyl jasmonate on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination and seedling development. *Plant Growth Regulation*, 7(3): 157-169.
- Corrêa, L. d. R., Paim, D. C., Schwambach, J., & Fett-Neto, A. G. (2005): Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Growth Regulation*, 45(1): 63-73.
- Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C., & Coldea, G. (2011): Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(2): 279-288.

- Coulombe, J. R. A. (2003): Pyrrolizidine alkaloids in foods. *Advances in food and nutrition research*, 45: 61-99.
- Cramer, C. L., Edwards, K., Dron, M., Liang, X., Dildine, S. L., Bolwell, G. P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., & Schuch, W. (1989): Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Molecular Biology*, 12(4): 367-383.
- Cuenca, B., & Vieitez, A. (2000): Influence of carbon source on shoot multiplication and adventitious bud regeneration in *in vitro* beech cultures. *Plant Growth Regulation*, 32(1): 1-12.
- Curtis, P., & Cross, B. (1954): Gibberellic acid. A new metabolite from the culture filtrates of *Gibberella fujikuroi*. *Chem. Ind*, 1066: 1954.
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004): Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1): 1-15.
- Czapski, J., & Saniewski, M. (1992): Stimulation of ethylene production and ethylene-forming enzyme activity in fruits of the non-ripening nor and rin tomato mutants by methyl jasmonate. *Journal of plant physiology*, 139(3): 265-268.
- Davies, K. M., Albert, N. W., & Schwinn, K. E. (2012): From landing lights to mimicry: the molecular regulation of flower colouration and mechanisms for pigmentation patterning. *Functional Plant Biology*.
- De Geyter, N., Gholami, A., Goormachtig, S., & Goossens, A. (2012): Transcriptional machineries in jasmonate - elicited plant secondary metabolism. *Trends in Plant Science*, 17(6): 349-359.
- de Paiva Neto, V. B., & Otoni, W. C. (2003): Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Scientia Horticulturae*, 97(3): 193-202.
- Dhaka, N., & Kothari, S. (2002): Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Helianthus annuus* L. *Plant Cell Reports*, 21(1): 29-34.
- Dhaka, N., & Kothari, S. (2005): Micropropagation of *Eclipta alba* (L.) Hassk – An important medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41(5): 658-661.
- DiCosmo, F., & Misawa, M. (1995): Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*, 13(3): 425-453.

- Diklić, N., Niketić, M., & Tomović, G. 1999. Crvena knjiga flore Srbije I Iščezli i krajnje ugroženi taksoni, V. Stevanović (Ed.), Ministarstvo za zaštitu životne sredine Republike Srbije. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. Zavod za zaštitu prirode Republike Srbije. Beograd: 251-479.
- Dreger, M., Stanisławska, M., Krajewska-Patan, A., Mielcarek, S., Mikołajczak, P. Ł., & Buchwald, W. (2009): Pyrrolizidine alkaloids—chemistry, biosynthesis, pathway, toxicity, safety and perspectives of medicinal usage. *Herba Polonica*, 55(4): 127-147.
- Drew, R., Considine, J., & McComb, J. (1993): Effect of fructose on growth of papaw shoot explants *in vitro*. *Australian journal of botany*, 41(6): 739-748.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I. (2013): Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, 198(1): 16-32.
- Eklund, P. C., Långvik, O. K., Wärnå, J. P., Salmi, T. O., Willför, S. M., & Sjöholm, R. E. (2005): Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3(18): 3336-3347.
- Eldridge, A. C., & Kwolek, W. F. (1983): Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(2): 394-396.
- Ellis, B., & Towers, G. (1970): Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochemical Journal*, 118(2): 291.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C., & Turner, J. G. (2002): The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *The Plant Cell Online*, 14(7): 1557-1566.
- Eshed, Y., Riov, J., & Atzmon, N. (1996): Rooting oak cuttings from gibberellin-treated stock plants. *HortScience*, 31(5): 872-873.
- Faria, R. T. d., Rodrigues, F. N., Oliveira, L. d. V., & Müller, C. (2004): *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira*, 22(4): 780-783.

- Farmer, E. E., Alméras, E., & Krishnamurthy, V. (2003): Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4): 372-378.
- Farnsworth, N. 1985. The role of medicinal plants in drug development. In: *In: Kroogsgard-Larsen, P., Brogger Christenses, S. (eds.). Natural Products and Drug Development. Denmark: Munsgaard Copenhagen: 17-30.*
- Faure, O., Diemer, F., Moja, S., & Jullien, F. (1998): Mannitol and thidiazuron improve *in vitro* shoot regeneration from spearmint and peppermint leaf disks. *Plant cell, tissue and organ culture*, 52(3): 209-212.
- Feldman, A. W., & Hanks, R. W. (1968): Phenolic content in the roots and leaves of tolerant and susceptible citrus cultivars attacked by *Radopholus similis*. *Phytochemistry*, 7(1): 5-12.
- Fett-Neto, A. G., Fett, J. P., Goulart, L. W. V., Pasquali, G., Termignoni, R. R., & Ferreira, A. G. (2001): Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology*, 21(7): 457-464.
- Fletcher, M. T., McKenzie, R. A., Blaney, B. J., & Reichmann, K. G. (2008): Pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* taxa from northern Australia: risk to grazing livestock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1): 311-319.
- Ford, Y.-Y., Taylor, J., Blake, P., & Marks, T. (2002): Gibberellin A3 stimulates adventitious rooting of cuttings from cherry (*Prunus avium*). *Plant Growth Regulation*, 37(2): 127-133.
- Fotopoulos, S., & Sotiropoulos, T. (2004): *In vitro* propagation of the peach rootstock: the effect of different carbon sources and types of sealing material on rooting. *Biologia plantarum*, 48(4): 629-631.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005): Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28(8): 1056-1071.
- Fu, P. P., Xia, Q., Lin, G., & Chou, M. W. (2004): Pyrrolizidine alkaloids - genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug metabolism reviews*, 36(1): 1-55.

- Gadzovska, S., Maury, S., Delaunay, A., Spasenoski, M., Joseph, C., & Hagege, D. (2007): Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones. *Plant cell, tissue and organ culture*, 89(1): 1-13.
- Gardens, R. B. 1908. Bulletin of miscellaneous information - Apendix. In: R. B. Gardens (Ed.). Kew.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. 2008. Plant tissue culture procedure- Background. In: *Plant propagation by tissue culture*, Springer: 1-28.
- Georgiev, M. I., Kuzeva, S. L., Pavlov, A. I., Kovacheva, E. G., & Ilieva, M. P. (2007): Elicitation of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension culture with abiotic elicitors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(2): 301-304.
- Gerrits, N., Turk, S. C., van Dun, K. P., Hulleman, S. H., Visser, R. G., Weisbeek, P. J., & Smeekens, S. C. (2001): Sucrose metabolism in plastids. *Plant physiology*, 125(2): 926-934.
- Gertlowski, C., & Petersen, M. (1993): Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34(2): 183-190.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12): 909-930.
- Glauser, G., Vallat, A., & Balmer, D. 2014. Hormone profiling, Vol. 1062: 597-608.
- Gómez Vásquez, R., Day, R., Buschmann, H., Randles, S., Beeching, J. R., & Cooper, R. M. (2004): Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor challenged cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Annals of botany*, 94(1): 87-97.
- Grafi, G. (2004): How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Developmental biology*, 268(1): 1-6.
- Grennan, A. K., & Gragg, J. (2009): How sweet it is: identification of vacuolar sucrose transporters. *Plant physiology*, 150(3): 1109-1110.

- Grubišić, D., Šavikin-Fodulović, K., Mišić, D., Giba, Z., & Konjević, R. (2004): *In vitro* stem elongation of stemless carline thistle. *Plant Growth Regulation*, 44(1): 65-69.
- Gruselle, R., Nicaise, C., & Boxus, P. (1995): Regulation of *in vitro* shoot multiplication in Persian walnut by different carbon sources and by ammonium phosphate. *Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux*, 30.
- Gülçin, İ. (2006): Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2): 213-220.
- Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T. M., & Zenk, M. H. (1992): Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(6): 2389-2393.
- Gupta, A. K., & Kaur, N. (2005): Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of biosciences*, 30(5): 761-776.
- Gutierrez, L., Mongelard, G., Floková, K., Păcurar, D. I., Novák, O., Staswick, P., Kowalczyk, M., Păcurar, M., Demailly, H., & Geiss, G. (2012): Auxin controls *Arabidopsis* adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *The Plant Cell Online*, 24(6): 2515-2527.
- Haberlandt, G. 1902. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. In: *Sitzungsber Math. Naturwiss, KI, Kais. Akad. Wiss., Wien*, Vol. 111: 69-92.
- Hackett, W. P. 1988. Donor plant maturation and adventitious root formation. In: *Adventitious Root Formation in Cuttings*, T. D. Davis, B. E. Haissig, & S. N. (Eds.), Dioscorides Press, Portland: 11-28.
- Halliwell, B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2): 312-322.
- Harada, H., & Murai, Y. (1996): Micropropagation of *Prunus mume*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 46(3): 265-267.
- Harborne, J. B. 1999. Classes and functions of secondary products from plants. In: *Chemicals from plants, Perspectives on Secondary Plant Products*, N. J. Walton, & D. E. Brown (Eds.), Imperial College Press: 1-25.
- Hartmann, T. (1996): Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80(1): 177-188.

- Hartmann, T. (2007): From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22–24): 2831-2846.
- Hazarika, B. (2003): Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science-Bangalore-*, 85(12): 1704-1712.
- Hazarika, B. (2006): Morpho - physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108(2): 105-120.
- Hazarika, B., Parthasarathy, V., Nagaraju, V., & Bhowmik, G. (2000): Sucrose induced biochemical changes in *in vitro* microshoots of *Citrus* species. *Indian Journal of Horticulture*, 57(1): 27-31.
- Hippolyte, I. 2000. *In vitro* rosmarinic acid production. In: *The Genus Salvia*, S. E. Kintzios (Ed.), Harwood Academic Publishers imprint, (ed.), Vol. 14: 233-242.
- Hraš, A. R., Hadolin, M., Knez, Ž., & Bauman, D. (2000): Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 71(2): 229-233.
- Hu, C., & Wang, P. 1986. Embryo culture: technique and applications. *Macmillan*: New York.
- Husain, M. K., & Anis, M. (2006): Rapid *in vitro* propagation of *Eclipta alba* (L.) Hassk. through high frequency axillary shoot proliferation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28(4): 325-330.
- Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. (2012): Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. *InTech.*, <http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/29569031/>.
- Huxtable, R. J. (1980): Herbal teas and toxins: novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States. *Perspect Biol Med*, 24(1): 1-14.
- Ilczuk, A., Jagieáo-Kubiec, K., & Jacygrad, E. (2013): The effect of carbon source in culture medium on micropropagation of common ninebark (*Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim.) 'Diable D'or'. *Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus*, 12(3): 23-33.
- Ilieva, M., & Pavlov, A. (1997): Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell-suspension culture. *Applied microbiology and biotechnology*, 47(6): 683-688.

- Jain, N., Bairu, M. W., Stirk, W. A., & Van Staden, J. (2009): The effect of medium, carbon source and explant on regeneration and control of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens*. *South African Journal of Botany*, 75(1): 117-121.
- Jaleel, C. A., Gopi, R., Gomathinayagam, M., & Panneerselvam, R. (2009): Traditional and non-traditional plant growth regulators alters phytochemical constituents in *Catharanthus roseus*. *Process Biochemistry*, 44(2): 205-209.
- Jaleel, C. A., Gopi, R., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., & Panneerselvam, R. (2007): Antioxidant potentials and ajmalicine accumulation in *Catharanthus roseus* after treatment with gibberellic acid. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 60(2): 195-200.
- Jo, E.-A., Tewari, R. K., Hahn, E.-J., & Paek, K.-Y. (2009): *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant cell, tissue and organ culture*, 96(3): 307-315.
- Josifović, M., Stjepanović, L., Kojić, M., & Diklić, N. 1974. Flora SR Srbije, *Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti / SANU-Odeljenje prirodno-matematičkih nauka*, Vol. VI.
- Kapai, V., Kapoor, P., & Rao, I. (2010): *In vitro* propagation for conservation of rare and threatened plants of India - A review. *International Journal of Biological Technology*, 1(2): 1-14.
- Karadeniz, F., Burdurlu, H. S., Koca, N., & Soyer, Y. (2005): Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29(4): 297-303.
- Karam, N. S., Jawad, F. M., Arikat, N. A., & Shibl, R. A. (2003): Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 73(2): 117-121.
- Kikowska, M., Budzianowski, J., Krawczyk, A., & Thiem, B. (2012): Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in *in vitro* cultures of *Eryngium planum* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(6): 2425-2433.
- Kim, Y.-s., Hahn, E.-j., Murthy, H. N., & Paek, K.-y. (2004): Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate. *Biotechnology Letters*, 26(21): 1619-1622.

- Kim, Y.-S., Yeung, E. C., Hahn, E.-J., & Paek, K.-Y. (2007): Combined effects of phytohormone, indole-3-butyric acid, and methyl jasmonate on root growth and ginsenoside production in adventitious root cultures of *Panax ginseng* CA Meyer. *Biotechnology Letters*, 29(11): 1789-1792.
- Kim, Y. 2002. Production of ginsenosides through bioreactor cultures of adventitious roots in ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer). Chungbuk National University, Chenogju, South Korea. Doktorska disertacija
- Knight, A. P., Kimberling, C. V., Stermitz, F. R., & Roby, M. R. (1984): *Cynoglossum officinale* (hound's-tongue)-a cause of pyrrolizidine alkaloid poisoning in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(6): 647-650.
- Koca, U., Çölgeçen, H., & Reheman, N. (2012): Progress in biotechnological applications of diverse species in Boraginaceae Juss. *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*: 200.
- Koch, K. (1996): Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1): 509-540.
- Koda, Y. (1997): Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiologia plantarum*, 100(3): 639-646.
- Korsangruang, S., Soonthornchareonnon, N., Chintapakorn, Y., Saralamp, P., & Prathanturarug, S. (2010): Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103(3): 333-342.
- Kozai, T. (1991): Photoautotrophic micropropagation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 27(2): 47-51.
- Kreis, W., & Reinhard, E. (1992): 12 β -Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells: Production of digoxin in 20-litre and 300-litre air-lift bioreactors. *Journal of biotechnology*, 26(2): 257-273.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011): A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89(3): 217-233.

- Krook, J., Vreugdenhil, D., & van der Plas, L. H. (2000): Uptake and phosphorylation of glucose and fructose in *Daucus carota* cell suspensions are differently regulated. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(7): 603-612.
- Krzyzanowska, J., Czubacka, A., Pecio, L., Przybys, M., Doroszevska, T., Stochmal, A., & Oleszek, W. (2012): The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha x piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108(1): 73-81.
- Kumari, G. J., & Sudhakar, C. (2003): Effects of jasmonic acid on groundnut during early seedling growth. *Biologia plantarum*, 47(3): 453-456.
- Landmann, C., Hücherig, S., Fink, B., Hoffmann, T., Dittlein, D., Coiner, H. A., & Schwab, W. (2011): Substrate promiscuity of a rosmarinic acid synthase from lavender (*Lavandula angustifolia* L.). *Planta*, 234(2): 305-320.
- Larson, R. A. (1988): The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27(4): 969-978.
- Larson, R. A. (1995): Plant defenses against oxidative stress. *Archives of insect biochemistry and Physiology*, 29(2): 175-186.
- Lê, C. (1989): Microbouturage *in vitro* du thym (*Thymus vulgaris* L.). *Thyme: the genus Thymus, medicinal and aromatic plants—industrial profiles*. Taylor & Francis, London: 177-196.
- Le Claire, E., Schwaiger, S., Banaigs, B., Stuppner, H., & Gafner, F. (2005): Distribution of a new rosmarinic acid derivative in *Eryngium alpinum* L. and other **Apiaceae**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11): 4367-4372.
- Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011): The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2): 288-306.
- Leva, A., Sadeghi, H., & Petruccelli, R. (2013): Carbohydrates modulate the *in vitro* growth of olive microshoots. I. The analysis of shoot growth and branching patterns. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(1): 53-60.
- Li, H.-R., Lee, H. C., Jung, M., & Shah, S. V. 2001. Treatment of diabetic nephropathy and microalbuminuria: Google Patents.
- Liddell, J. R. (2000): Pyrrolizidine alkaloids. *Natural Product Reports*, 17(5): 455-462.

- Liddell, J. R. (2001): Pyrrolizidine alkaloids. *Natural Product Reports*, 18(4): 441-447.
- Liddell, J. R. (2002): Pyrrolizidine alkaloids. *Natural Product Reports*, 19(6): 773-781.
- Lin, L., & Wu, J. (2002): Enhancement of shikonin production in single and two phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low energy ultrasound. *Biotechnology and bioengineering*, 78(1): 81-88.
- Lin, X., & Leung, D. M. (2002): Culture of isolated zygotic embryos of *Pinus radiata* D. Don. Part I: Factors influencing *in vitro* germination and growth of isolated embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(2): 191-197.
- Liu, X.-N., Zhang, X.-Q., Zhang, S.-X., & Sun, J.-S. (2007): Regulation of metabolite production by precursors and elicitors in liquid cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 91(1): 1-7.
- Loreti, E., De Bellis, L., Alpi, A., & Perata, P. (2001): Why and how do plant cells sense sugars? *Annals of botany*, 88(5): 803-812.
- Lu, W., Gao, S., Xiao, Y., Zhang, L., Li, J., & Chen, W. (2011): A liquid chromatographic–tandem mass spectrometric method for the quantitation of eight components involved in lithospermic acid B biosynthesis pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5: 1664-1672.
- Lu, Y., & Foo, Y. L. (2002): Polyphenolics of *Salvia* — A review. *Phytochemistry*, 59(2): 117-140.
- Ljaljević Grbić, M., Vukojević, J., Glamočlija, J., Janošević, D., Grubišić, D., & Mijović, A. (2005): Gljive na ugroženim i retkim biljkama. *8th Symposium on the flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions. Book of Abstracts.*: 23.
- Ma, P., Liu, J., Zhang, C., & Liang, Z. (2013): Regulation of water-soluble phenolic acid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Applied biochemistry and biotechnology*, 170(6): 1253-1262.
- Mahesh, A., & Jeyachandran, R. (2012): Influence of plant growth regulators on micropropagation and *in vitro* flowering of *Trichodesma indicum* (Linn) R. Br. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*(ahead-of-print): 1-7.

- Makkar, H. P., Siddhuraju, P., & Becker, K. 2007. Plant secondary metabolites. *Humana Press*.
- Maksymiec, W., & Krupa, Z. (2007): Effects of methyl jasmonate and excess copper on root and leaf growth. *Biologia plantarum*, 51(2): 322-326.
- Mandel, S., & Youdim, M. B. (2004): Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free radical biology & medicine*, 37(3): 304-317.
- Mandić, B. M., Simić, M. R., Vučković, I. M., Vujisić, L. V., Novaković, M. M., Trifunović, S. S., Nikolić-Mandić, S. D., Tešević, V. V., Vajs, V. V., & Milosavljević, S. M. (2013): Pyrrolizidine alkaloids and fatty acids from the endemic plant species *Rindera umbellata* and the effect of lindelofine-N-oxide on tubulin polymerization. *Molecules*, 18(9): 10694-10706.
- Marino, G., Bertazza, G., Magnanini, E., & Altan, A. D. (1993): Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. *Plant cell, tissue and organ culture*, 34(3): 235-244.
- Matkowski, A. (2008): Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants—A review. *Biotechnology Advances*, 26(6): 548-560.
- Matsukura, C., Itoh, S.-i., Nemoto, K., Tanimoto, E., & Yamaguchi, J. (1998): Promotion of leaf sheath growth by gibberellic acid in a dwarf mutant of rice. *Planta*, 205(2): 145-152.
- Maurya, D. K., & Devasagayam, T. P. A. (2010): Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12): 3369-3373.
- Mezzetti, B., Conte, L. S., & Rosati, P. (1991): *Actinidia deliciosa in vitro* II. Growth and exogenous carbohydrates utilization by explants. *Plant cell, tissue and organ culture*, 26(3): 153-160.
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000): The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4): 673-751.
- Misawa, M. 1985. Production of useful plant metabolites. In: *Plant cell culture*, Springer: 59-88.

- Misawa, M. 1994. Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites. *FAO*.
- Misra, A., Srivastava, N., Srivastava, A., & Khan, A. (2009): Influence of etherel and gibberellic acid on carbon metabolism, growth, and alkaloids accumulation in *Catharanthus roseus* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(11): 515-520.
- Mišić, D., Grubišić, D., & Konjević, R. (2006): Micropropagation of *Salvia brachyodon* through nodal explants. *Biologia plantarum*, 50(3): 473-476.
- Mišić, D., Maksimović, V., Todorović, S., Grubišić, D., & Konjević, R. (2005a): Influence of carbohydrate source on *Nepeta rtanjensis* growth, morphogenesis, and nepetalactone production *in vitro*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 53(2): 103-108.
- Mišić, D. M., Ghalawenji, N. A., Grubišić, D. V., & Konjević, R. M. (2005b): Micropropagation and reintroduction of *Nepeta rtanjensis*, an endemic and critically endangered perennial of Serbia. *Phyton*, 45(1): 9-20.
- Mitra, A., Dey, S., & Sawarkar, S. (1998): Photoautotrophic *in vitro* multiplication of the orchid *Dendrobium* under CO₂ enrichment. *Biologia plantarum*, 41(1): 145-148.
- Mitrović, A., Živanović, B., & Čulafić, L. (2000): The effects of photoperiod, glucose and gibberellic acid on growth *in vitro* and flowering of *Chenopodium murale*. *Biologia plantarum*, 43(2): 173-177.
- Mittler, R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9): 405-410.
- Miyamoto, K., Oka, M., & Ueda, J. (1997): Update on the possible mode of action of the jasmonates: Focus on the metabolism of cell wall polysaccharides in relation to growth and development. *Physiologia plantarum*, 100(3): 631-638.
- Mizukami, H., Tabira, Y., & Ellis, B. E. (1993): Methyl jasmonate - induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 12(12): 706-709.
- Mohamed, M. A. H., & Alsadon, A. A. (2010): Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. *Scientia Horticulturae*, 123(3): 295-300.

- Molyneux, P. (2004): The use of the stable free radical diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2): 211-219.
- Moncousin, C., Ribaux, M., & Gavillet, S. (1992): Effects of type of carbohydrate during proliferation and rooting of microcuttings of *Malus Jork 9*. *Agronomie*, 12(10): 775-781.
- Morant, M., Hehn, A., & Werck-Reichhart, D. (2002): Conservation and diversity of gene families explored using the CODEHOP strategy in higher plants. *BMC plant biology*, 2(1): 7.
- Morimoto, S., Goto, Y., & Shoyama, Y. (1994): Production of lithospermic acid B and rosmarinic acid in callus tissue and regenerated plantlets of *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of natural products*, 57(6): 817-823.
- Mulabagal, V., & Tsay, H.-S. (2004): Plant cell cultures - An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2(1): 29-48.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3): 473-497.
- Murthy, H. N., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. (2008): Adventitious roots and secondary metabolism. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24(5): 711-716.
- Nair, V. D., Panneerselvam, R., Gopi, R., & Hong-bo, S. (2013): Elicitation of pharmacologically active phenolic compounds from *Rauwolfia serpentina* Benth. Ex. Kurtz. *Industrial Crops and Products*, 45: 406-415.
- Namdeo, A. (2007): Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews*, 1(01): 69-79.
- Naujoks, G. 2007. Micropropagation of *Salix caprea* L. In: *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, Springer: 213-220.
- Nešković, M., Konjević, R., & Čulafić, L. 2010. Fiziologija biljaka. *NNK - International*: Beograd.
- Nobre, V., Dantas, A., Riet-Correa, F., Barbosa Filho, J., Tabosa, I., & Vasconcelos, J. (2005): Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. *Toxicon*, 45(3): 347-352.

- Nowak, B., Miczyński, K., & Hudy, L. (2004): Sugar uptake and utilisation during adventitious bud differentiation on *in vitro* leaf explants of 'Wegierka Zwykła' plum (*Prunus domestica*). *Plant cell, tissue and organ culture*, 76(3): 255-260.
- Ogata, A., Tsuruga, A., Matsuno, M., & Mizukami, H. (2004): Elicitor-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures: Activities of rosmarinic acid synthase and the final two cytochrome P450-catalyzed hydroxylations. *Plant biotechnology*, 21(5): 393-396.
- Oliveira, J., Tavares, R. M., & Gerós, H. (2002): Utilization and transport of glucose in *Olea europaea* cell suspensions. *Plant and Cell Physiology*, 43(12): 1510-1517.
- Ozcelik, B., Lee, J., & Min, D. (2006): Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of food science*, 68(2): 487-490.
- Ozudogru, E. A., Kaya, E., Kirdok, E., & Issever-Ozturk, S. (2011): *In vitro* propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47(2): 309-320.
- Pabsch, K., Rao, N., Wandrey, C., Petersen, M., & Alfermann, A. (1991): Chemo enzymatic synthesis of rosmarinic acid. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 110(5): 199-205.
- Pal, A., Negi, V. S., & Borthakur, D. (2012): Efficient *in vitro* regeneration of *Leucaena leucocephala* using immature zygotic embryos as explants. *Agroforestry systems*, 84(2): 131-140.
- Palmer, H. J., & Paulson, K. E. (1997): Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutrition Reviews*, 55(10): 353-361.
- Pan, M.-H., Lai, C.-S., Wu, J.-C., & Ho, C.-T. 2013. Effect of flavonoids from fruits and vegetables in the prevention and treatment of cancer. In: *Cancer Chemoprevention and Treatment by Diet Therapy*, Springer: 23-54.
- Park, S. U., Uddin, R., Xu, H., Kim, Y. K., & Lee, S. Y. (2008): Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. *African Journal of Biotechnology*, 7(25): 4959-4965.

- Pass, D., Hogg, G., Russell, R., Edgar, J., Tence, I., & Rikard-Bell, L. (1979): Poisoning of chickens and ducks by pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium europaeum*. *Australian veterinary journal*, 55(6): 284-288.
- Pawlicki, N., & Welander, M. (1995): Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9. *Plant Science*, 106(2): 167-176.
- Payne, G. F., Payne, N. N., Shuler, M. L., & Asada, M. (1988): In situ adsorption for enhanced alkaloid production by *Catharanthus roseus*. *Biotechnology Letters*, 10(3): 187-192.
- Pérez, F. J., Meza, P., Berti, M., & Pinto, M. (2000): Effect of carbon source and sucrose concentration on growth and hexose accumulation of grape berries cultured *in vitro*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 61(1): 37-40.
- Petersen, M. (2013): Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochemistry Reviews*: 1-21.
- Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Janiak, V., Kim, K. H., Sander, M., Weitzel, C., & Wolters, S. (2009): Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 70(15–16): 1663-1679.
- Petersen, M., Häusler, E., Karwatzki, B., & Meinhard, J. (1993): Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei* Benth. *Planta*, 189(1): 10-14.
- Petersen, M., & Simmonds, M. S. J. (2003): Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2): 121-125.
- Petersen, M., Szabo, E., Meinhard, J., Karwatzki, B., Gertlowski, C., Kempin, B., & Fuß, E. (1995): Biosynthesis and accumulation of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 43(2): 89-92.
- Pezzuto, J. M. 1995. Natural product cancer chemoprotective agents. In: *In: Arnason, J.T., Mata, R., Romeo, J.T. (eds.) Recent advances in phytochemistry. Phytochemistry of medicinal plants, vol. 29. New York: Plenum: 19–45.*
- Pinchuk, I., Shoval, H., Dotan, Y., & Lichtenberg, D. (2012): Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, 165(6): 638-647.
- Piotrowska, A., & Bajguz, A. (2011): Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry*, 72(17): 2097-2112.

- Pospóšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D., & Plzáková, Š. (1999): Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia plantarum*, 42(4): 481-497.
- Potter, J. D. (2005): Vegetables, fruit, and cancer. *The Lancet*, 366: 527-530.
- Pourcel, L., Irani, N. G., Koo, A. J., Bohorquez-Restrepo, A., Howe, G. A., & Grotewold, E. (2013): A chemical complementation approach reveals genes and interactions of flavonoids with other pathways. *The Plant Journal*.
- Prakash, A. S., Pereira, T. N., Reilly, P. E., & Seawright, A. A. (1999): Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443(1): 53-67.
- Rai, M. K. (2010): Review: Biotechnological strategies for conservation of rare and endangered medicinal plants. *Biodiversitas*, 11(3): 157-166.
- Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. A. (2002): Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2): 101-153.
- Ramawat, K. G., & Mérillon, J.-M. 2008. Bioactive molecules and medicinal plants. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.
- Rasenack, R., Müller, C., Kleinschmidt, M., Rasenack, J., & Wiedenfeld, H. (2003): Veno-occlusive disease in a fetus caused by pyrrolizidine alkaloids of food origin. *Fetal diagnosis and therapy*, 18(4): 223-225.
- Rateb, M. E., El-Hawary, S. S., El-Shamy, A. M., & Yousef, E. M. (2007): Production of parthenolide in organ and callus cultures of *Tanacetum parthenium* (L.). *African Journal of Biotechnology*, 6(11).
- Ravnikar, M., Vilhar, B., & Gogala, N. (1992): Stimulatory effects of jasmonic acid on potato stem node and protoplast culture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 11(1): 29-33.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9): 1231-1237.
- Rhee, H. S., Cho, H.-Y., Son, S. Y., Yoon, S.-Y. H., & Park, J. M. (2010): Enhanced accumulation of decursin and decursinol angelate in root cultures and intact roots of *Angelica gigas* Nakai following elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101(3): 295-302.

- Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4): 152-159.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7): 933-956.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999): Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4): 401-436.
- Roberts, S. C., & Shuler, M. L. (1997): Large-scale plant cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(2): 154-159.
- Robins, R. J., & Rhodes, M. J. 1988. Manipulating secondary metabolism in culture. *Cambridge University Press*.
- Roeder, E. (1995): Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie*, 50(2): 83-98.
- Roeder, E. (2000): Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie*, 55(10): 711-726.
- Roeder, E., & Wiedenfeld, H. (2013): Plants containing pyrrolizidine alkaloids used in the Traditional Indian Medicine including Ayurveda. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68(2): 83-92.
- Roitsch, T. (1999): Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(3): 198-206.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2006): Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual review of plant biology*, 57: 675-709.
- Romano, A., Noronha, C., & Martins-Loucao, M. (1995): Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. *Plant cell, tissue and organ culture*, 40(2): 159-167.
- Ruan, Y.-L. (2012): Signaling role of sucrose metabolism in development. *Molecular Plant*, 5(4): 763-765.
- Rymen, B., & Sugimoto, K. (2012): Tuning growth to the environmental demands. *Current Opinion in Plant Biology*.

- Sancak, C., Mirici, S., & Özcan, S. (2000): High frequency shoot regeneration from immature embryo explants of Hungarian vetch. *Plant cell, tissue and organ culture*, 61(3): 231-235.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A., & Estelle, M. (2009): Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology*, 5(5): 301-307.
- Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B., & Fernandes-Ferreira, M. (2002): Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*, 162(6): 981-987.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000): Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8): 2073S-2085S.
- Scarpati, M., & Oriente, G. (1958): Isolation and constitution of rosmarinic acid from *Rosmarinus officinalis* (Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.)). . *Ricerca Scientia*, 28: 2329-2333.
- Schulz, J. B., Lindenau, J., Seyfried, J., & Dichgans, J. (2000): Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*, 267(16): 4904-4911.
- Sghaier, B., Kriaa, W., Bahloul, M., Novo, J. V. J., & Drira, N. (2009): Effect of ABA, arginine and sucrose on protein content of date palm somatic embryos. *Scientia Horticulturae*, 120(3): 379-385.
- Shahzad, A., & Saeed, T. 2013. *In vitro* conservation protocols for some rare medicinal plant species. In: *Recent Trends in Biotechnology and Therapeutic Applications of Medicinal Plants*, Springer, Vol. 10: 263-291.
- Sharma, K., Rathour, R., Sharma, R., Goel, S., Sharma, T., & Singh, B. (2008): *In vitro* cormlet development in *Crocus sativus*. *Biologia plantarum*, 52(4): 709-712.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009): DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4): 1202-1205.
- Shetty, K. (2007): Rosmarinic acid biosynthesis and mechanism of action. *Food Science and Technology*, Taylor & Francis Group, New York: 187-208.
- Silvente, S. T., & Trippi, V. S. (1986): Sucrose-modulated morphogenesis in *Anagallis arvensis* L. *Plant and Cell Physiology*, 27(2): 349-354.

- Simić, M. R. 2007. Izolovanje pirolizidinskih alkaloida iz biljne vrste *Rindera umbellata*. Univerzitet u Beogradu, Magistarska teza.
- Simonović, A. 2011. Biotehnologija i genetičko inženjerstvo biljaka. *NNK International*: Beograd.
- Singh, P., Srivastava, N., Mishra, A., & Sharma, S. (2000): Influence of etherel and gibberellic acid on carbon metabolism, growth, and essential oil accumulation in Spearmint (*Mentha spicata*). *Photosynthetica*, 36(4): 509-517.
- Slater, A., Scott, N. W., & Fowler, M. R. 2003. Plant Biotechnology. The Genetic Manipulation of Plants. *Oxford University Press*: Oxford.
- Smeekens, S. (2000): Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 51(1): 49-81.
- Smith, L., & Culvenor, C. (1981): Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. *Journal of natural products*, 44(2): 129-152.
- Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A., & Perata, P. (2006): Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 140(2): 637-646.
- Sonnewald, U., Brauer, M., Schaewen, A., Stitt, M., & Willmitzer, L. (1991): Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *The Plant Journal*, 1(1): 95-106.
- Soobrattee, M. A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I. & Bahorun, T. (2005): Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research*, 579: 200-213.
- Sperl, W., Stuppner, H., Gassner, I., Judmaier, W., Dietze, O., & Vogel, W. (1995): Reversible hepatic veno-occlusive disease in an infant after consumption of pyrrolizidine-containing herbal tea. *European journal of pediatrics*, 154(2): 112-116.
- Stahl-Biskup, E., & Sáez, F. 2002. Thyme: the genus *Thymus*. *CRC Press*.
- Staniek, A., Bouwmeester, H., Fraser, P. D., Kayser, O., Martens, S., Tissier, A., van der Krol, S., Wessjohann, L., & Warzecha, H. (2013): Natural products - modifying metabolite pathways in plants. *Biotechnology Journal*, 8(10): 1159-1171.

- Stanzel, M., Sjolund, R. D., & Komor, E. (1988): Transport of glucose, fructose and sucrose by *Streptanthus tortuosus* suspension cells. *Planta*, 174(2): 201-209.
- Steffen, J. D., Sachs, R. M., & Hackett, W. P. (1988): Growth and development of reproductive and vegetative tissues of *Bougainvillea* cultured *in vitro* as a function of carbohydrate. *American journal of botany*, 75: 1219-1224.
- Stevanovic B. Bull. Inst. Jard. bot. Univ. Beograd 12, -. E. s. (1977 [1988]): Ekoanatomske adaptacije nekih stepskih biljaka iz zajednice *Chrysopogonatum pannonicum* L. Stjep.-Ves. na Deliblatskoj Pescari. [Ecoanatomical adaptations of some steppe plants in the community *Chrysopogonatum pannonicum* L. Stjep.-Ves. in Deliblatska Pescara sands.]. *Bull. Inst. Jard. bot. Univ. Beograd* 12: 17-30.
- Stevanović, V. (1999): Crvena knjiga flore Srbije I. *Ministarstvo za zaštitu životne sredine Republike Srbije. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. Zavod za zaštitu prirode Republike Srbije. Beograd.*
- Stevanović, V., Jovanović, S., Lakusić, D., Tomović, G., Niketić, M., & Milanković, K. (2006): Ugrožene biljke Srbije (priručnik o zaštiti retkih i ugroženih biljaka). *IP NNK Internacional, Beograd.*
- Strazzer, P. (2013): The modification of metabolic profile in plant cell cultures as a strategy to investigate the biological role of secondary metabolites. Univerzitet u Veroni, Doktorska disertacija
- Syklowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., Szyszko, E., Graikou, K., Jeziorek, M., Kuzma, L., & Chinou, I. (2012): Phenolic compounds from *in vitro* cultures of *Rindera graeca* Boiss. & Heldr. *Planta Medica*, 78(11): 1221-1221.
- Szabo, E., Thelen, A., & Petersen, M. (1999): Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Reports*, 18(6): 485-489.
- Szarka, A., Horemans, N., Passarella, S., Tarcsay, Á., Örsi, F., Salgó, A., & Bánhegyi, G. (2008): Demonstration of an intramitochondrial invertase activity and the corresponding sugar transporters of the inner mitochondrial membrane in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Planta*, 228(5): 765-775.

- Takii, H., MATsUMoTo, K., Kometani, T., Okada, S., & Fushiki, T. (1997): Lowering effect of phenolic glycosides on the rise in postprandial glucose in mice. *Bioscience Biotechnology And Biochemistry*, 61: 1531-1535.
- Tampe, P. A., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (2001): Jasmonic acid inhibition of *in vitro* shoot organogenesis in *Pinus radiata* cotyledons. *Journal of plant physiology*, 158(5): 607-611.
- Tanaka, T., Morimoto, S., Nonaka, G., Nishioka, I., Yokozawa, T., Chung, H. y., & Oura, H. (1989): Magnesium and ammonium-potassium lithospermates B, the active principles having a uremia-preventive effect from *Salvia miltiorrhiza*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 37(2): 340-344.
- Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013): Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *ISRN Biochemistry*, 2013.
- Todorović, S., Grubišić, D., Giba, Z., Mišić, D., & Konjević, R. (2006): Sucrose effects on *in vitro* fruiting and seed production of *Centaureum pulchellum*. *Biologia plantarum*, 50(4): 771-774.
- Tognetti, J. A., Pontis, H. G., & Noël, G. M. M. (2013): Sucrose signaling in plants: A world yet to be explored. *Plant signaling & behavior*, 8(3): e23316.
- Tomiya, S., Sakai, S., Nishiyama, T., & Yamada, F. (1993): Factors influencing the antioxidant activities of phenols by an ab initio study. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 66(1): 299-304.
- Toro, F. J., Martín-Closas, L., & Pelacho, A. M. (2003): Jasmonates promote cabbage (*Brassica oleracea* L. var *Capitata* L.) root and shoot development. *Plant and Soil*, 255(1): 77-83.
- Tsuruga, A., Terasaka, K., Kamiya, K., Satake, T., & Mizukami, H. (2006): Elicitor-induced activity of isorinic acid 3'-hydroxylase, an enzyme catalyzing the final step of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Biotechnology, Tokyo*, 23(3): 297.
- Tung, P., Hooker, T. S., Tampe, P. A., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996): Jasmonic acid: effects on growth and development of isolated tomato roots cultured *in vitro*. *International Journal of Plant Sciences*: 713-721.

- Ueda, J., & Kato, J. (1980): Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant physiology*, 66(2): 246-249.
- Ueda, J., Miyamoto, K., & Kamisaka, S. (1995): Inhibition of the synthesis of cell wall polysaccharides in oat coleoptile segments by jasmonic acid: relevance to its growth inhibition. *Journal of Plant Growth Regulation*, 14(2): 69-76.
- Ulbrich, B., Wiesner, W., & Arens, H. 1985. Large-Scale Production of Rosmarinic Acid from Plant Cell Cultures of *Coleus blumei* Benth. In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, B. W. R. E. E. Neumann KH (Ed.), Springer: 293-303.
- Varshney, A., & Johnson, T. S. (2010): Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 4(2): 139-148.
- Verpoorte, R., Contin, A., & Memelink, J. (2002): Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1(1): 13-25.
- Verpoorte, R., van der Heijden, R., & Memelink, J. (2000): Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic research*, 9(4-5): 323-343.
- Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Ten Hoopen, H., & Memelink, J. (1999): Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters*, 21(6): 467-479.
- Vinterhalter, D., & Vinterhalter, B. 1996. Kultura *in vitro* i mikropropagacija biljaka. *Axial*: Beograd.
- Wachira, F. (1997): *In vitro* shoot multiplication of *Eucalyptus grandis*. *African Crop Science Journal*, 5(3): 239-251.
- Wainwright, H., & Scrace, J. (1989): Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings on *in vivo* establishment. *Scientia Horticulturae*, 38(3-4): 261-267.
- Wang, S., Ichii, M., Taketa, S., Xu, L., Xia, K., & Zhou, X. (2002): Lateral root formation in rice (*Oryza sativa*): promotion effect of jasmonic acid. *Journal of plant physiology*, 159(8): 827-832.

- Welander, M., & Pawlicki, N. 1994. Carbon compounds and their influence on *in vitro* growth and organogenesis. In: *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*, Springer: 83-93.
- Welander, M., Welander, N., & Brackman, A.-S. (1985): Regulation of *in vitro* shoot multiplication in *Syringa*, *Alnus* and *Malus* by different carbon sources. *Journal of horticultural science*, 64(3): 361-366.
- Weston, L., & Mathesius, U. (2013): Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*: 1-15.
- Wheeler, A., & Humphries, E. (1964): Separation of the effects of gibberellic acid on leaf and stem growth of dwarf French Bean. *Nature*, 202(616).
- Wilen, R. W., van Rooijen, G. J., Pearce, D. W., Pharis, R. P., Holbrook, L. A., & Moloney, M. M. (1991): Effects of jasmonic acid on embryo-specific processes in *Brassica* and *Linum* oilseeds. *Plant physiology*, 95(2): 399-405.
- Williams, R. J., Spencer, J. P., & Rice-Evans, C. (2004): Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*, 36(7): 838-849.
- Wind, J., Smeekens, S., & Hanson, J. (2010): Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry*, 71(14): 1610-1614.
- Wink, M. (1988): Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 75(2): 225-233.
- Wink, M. 2010. Annual Plant Reviews, Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. *Wiley-Blackwell*.
- Wink, M. 2011. Annual Plant Reviews, Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Vol. 40: Wiley-Blackwell.
- Xiao, Y., Gao, S., Di, P., Chen, J., Chen, W., & Zhang, L. (2009): Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Physiologia plantarum*, 137(1): 1-9.
- Xiao, Y., Gao, S., Di, P., Chen, J., Chen, W., & Zhang, L. (2010): Lithospermic acid B is more responsive to silver ions (Ag⁺) than rosmarinic acid in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Bioscience reports*, 30: 33-40.
- Yamaguchi, S. (2008): Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual review of plant biology*, 59: 225-251.

- Yamamoto, H., Zhao, P., Yazaki, K., & Inoue, K. (2002): Regulation of lithospermic acid B and shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50(8): 1086-1090.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J., & Wu, J. Y. (2006): Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science*, 170(4): 853-858.
- Yáñez, J. A., Remsberg, C. M., Takemoto, J. K., Vega-Villa, K. R., Andrews, P. K., Sayre, C. L., Martinez, S. E., & Davies, N. M. (2012): Polyphenols and Flavonoids: An Overview. *Flavonoid Pharmacokinetics: Methods of Analysis, Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Toxicology*: 1-69.
- Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., & Hafiz, I. A. (2012): Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular biology reports*: 1-13.
- Yasodha, R., Kamala, S., Kumar, S., Kumar, P. D., & Kalaiarasi, K. (2008): Effect of glucose on *in vitro* rooting of mature plants of *Bambusa nutans*. *Scientia Horticulturae*, 116(1): 113-116.
- Yu, K.-W., Gao, W., Hahn, E.-J., & Paek, K.-Y. (2002): Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* CA Meyer. *Biochemical Engineering Journal*, 11(2): 211-215.
- Yu, X., & Reed, B. M. (1993): Improved shoot multiplication of mature hazelnut (*Corylus avellana* L.) *in vitro* using glucose as a carbon source. *Plant Cell Reports*, 12(5): 256-259.
- Yuan, J.-P., Chen, H., & Chen, F. (1998): Simultaneous determination of rosmarinic acid, lithospermic acid B, and related phenolics in *Salvia miltiorrhiza* by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7): 2651-2654.
- Zeng, X.-C., Zhou, X., Zhang, W., Murofushi, N., Kitahara, T., & Kamuro, Y. (1999): Opening of rice floret in rapid response to methyl jasmonate. *Journal of Plant Growth Regulation*, 18(4): 153-158.
- Zhang, Z., Zhou, W., Li, H., Zhang, G., Subrahmaniyan, K., & Yu, J. (2006): Effect of jasmonic acid on *in vitro* explant growth and microtuberization in potato. *Biologia plantarum*, 50(3): 453-456.

Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005): Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4): 283-333.

Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001): Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11): 5165-5170.

BioEdit <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.

BLAST http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome

<http://linneanonline.org/view/correspondence/Rinder=3AAndreas=3A=3A/Linnaeus=3ACarl=3A=3A.html>

<http://www.diversityoflife.org/taxpage/0/family/Boraginaceae.html>

<http://www.plantsystematics.org/taxpage/0/genus/Rindera.html>

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Марија Д. Перић (рођ. Лацић) рођена је 10.6.1972. године у Крушевцу. Основну школу и гимназију завршила је у Крушевцу. Биолошки факултет Универзитета у Београду уписала је школске 1991/1992. године на студијској групи Биологија. Дипломирала је у априлу 1999. године и стекла звање дипломираног биолога. Докторске студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду у оквиру студијског програма Експериментална и примењена ботаника - Физиологија и молекуларна биологија биљака, уписала је школске 2007/2008. године.

Током маја и јуна 1999. године као Сарадник у настави радила на Катедри за морфологију и систематику биљака Биолошког факултета Универзитета у Београду. У периоду од 2000 - 2006. године радила у предузећу “Лунатроник” а.д, Београд, након чега је наставила са радом током 2006 - 2007. године у предузећу “UNI-CHEM” д.о.о. из Београда. Током 2007. – 2008. године постала Сарадник у настави на Катедри за физиологију биљака Биолошког факултета Универзитета у Београду где је од маја 2008. године ангажована као Асистент током два трогодишња мандата.

У периоду од 2009 до 2013. године била је ангажована на међународном FP7 пројекту „**TERPMED** - *Plant Terpenoids for Human Health: a chemical and genomic approach to identify and produce bioactive compounds* (Grant Agreement бр. 227448).

Марија Д. Перић је члан Друштва за физиологију биљака Србије, Српског биолошког друштва и Федерације европских друштава за биљну физиологију (*FESPB*).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Перић

број уписа ЕА070006

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Физиолошка и фитохемијска карактеризација биљака
врсте *Rindera umbellata* (Waldst. & Kit.) Bunge гајених *in vitro*“**

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

Потпис докторанда

У Београду, 10.1.2014.

Перић Марија

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора _____ Марија Перић _____

Број уписа _____ ЕА070006 _____

Студијски програм _____ Физиологија и молекуларна биологија биљака _____

Наслов рада _____ **Физиолошка и фитохемијска карактеризација
биљака врсте *Rindera umbellata* (Waldst. & Kit.) Bunge
гајених *in vitro***“

Ментори _____ др Слађана Тодоровић _____ и _____ др Душица Јаношевић _____

Потписани _____ Марија Перић _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 10.1.2014. _____

Перић Марија

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

**„Физиолошка и фитохемијска карактеризација биљака врсте
Rindera umbellata (Waldst. & Kit.) Bunge гајених *in vitro*“**

која је моје ауторско дело.

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

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

① Ауторство

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 10.1.2014.

Ђеорге Марковић

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

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

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

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

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

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

Прилог 4.



РЕПУБЛИКА СРБИЈА
МИНИСТАРСТВО ЖИВОТНЕ СРЕДИНЕ,
РУДАРСТВА И ПРОСТОРНОГ ПЛАНИРАЊА

Омладинских бригада 1
11070 Нови Београд

Тел + 381 (011) 31-31-357; 31-31-359 / Факс + 381 (011) 31-31-394 / www.ekoplan.gov.rs

REPUBLIC OF SERBIA
MINISTRY OF ENVIRONMENT,
MINING AND SPATIAL PLANNING

1, Omladinskih brigada Str.
11070 New Belgrade



По мери природе

ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОШКА ИСТРАЖИВАЊА

"СЕНИША СТАНКОВИЋ"

Број 01-613

Датум 19.05.2011. год

БЕОГРАД, Бул. деспота Стефана бр.142

Бр/№: 353-01-184/2011-03

Датум/Date: 05.05.2011. године

Министарство животне средине, рударства и просторног планирања, државни секретар решењем број 021-01-8/2011 од 28.03.2011. године, на основу члана 24 став 3. Закона о државној управи («Службени гласник РС», бр.79/05,101/07) на основу члана 78. Закона о заштити природе («Службени гласник РС», број 36/09,88/10 и 91/10), члана 4 и 6 став 2 Правилника о проглашењу и заштити строго заштићених и заштићених дивљих врста биљака, животиња и гљива («Службени гласник РС», број 5/10), а по претходно прибављеном мишљењу Завода за заштиту природе Србије и Покрајинског завода за заштиту природе, издаје

ДОЗВОЛУ ЗА САКУПЉАЊЕ СТРОГО ЗАШТИЋЕНИХ И ЗАШТИЋЕНИХ ВРСТА БИЉАКА У НАУЧНОИСТРАЖИВАЧКЕ СВРХЕ

Институту за биолошка истраживања "Синиша Станковић", Бул. Деспота Стефана 142 из Београда, одобрава се сакупљање строго заштићених врста (*Rindera umbellata*), (*Dracosephalum ruyschiana*), (*Nepeta rtanjensis*) и заштићених врста (*Centaurium erythraea*), (*Gentiana asclepiadea*), (*Gentiana cruciata*), (*Gentiana lutea*), (*Gentiana pneumonanthe*) за потребе пројекта „Физиолошка, хемијска и молекуларна анализа деривата одабраних ретких и угрожених биљних врста у циљу *ex situ* заштите и продукције биолошки активних једињења”.

Корисник дозволе дужан је да Министарству, Заводу за заштиту природе Србије, Покрајинском заводу за заштиту природе, достави извештаје о резултатима истраживања и управљачу уколико је сакупљање обављено на заштићеном подручју.

Дозвола се издаје за период 2011. године.

Образложење

Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић", поднео је захтев за сакупљање семена и делова листова строго заштићених и заштићених врста биљака, 10 јединки из сваке предвиђене популације по врсти, у научноистраживачке сврхе.

Приликом разматрања захтева, а на основу мишљења Завода за заштиту природе Србије, бр (03-019-956/2) и Покрајинског завода за заштиту природе бр (03-646), Министарство је оценило да су испуњени услови за сакупљање строго заштићених и заштићених врста биљака, у научноистраживачке сврхе.

Подручја на којима ће се обавити прикупљање наведених врста су Ртањ, Лазарев кањон, кањон реке Замне, Хомоњске планине-потез око Жагубице, Власинско језеро, Стара планина, Суворор, Пештер, Тара, Копаоник, долина Лима, Трешњица, Фрушка гора и Делиблатска пешчара.

Пројектом руководи проф. др Драгољуб Грубишић, а учесници на пројекту су др Данијела Мишић, Бранислав Шилер, др Сузана Живковић, мр Милутин Ђуричковић, Тијана Бањанац и Милорад Вујичић.

На основу изложеног одлучено је као у диспозитиву дозволе из разлога што су испуњени услови, из члана 78. Закона о заштити природе и члана 4 и 6 став 2. Правилника о проглашењу и заштити строго заштићених и заштићених дивљих врста биљака, животиња и гљива.

REPUBLIKA SRBIJA
MINISTARSTVO ZAŠTITE I VEŠTAČENJE

ПОУКА О ПРАВНОМ СРЕДСТВУ: Дозвола је коначна у управном поступку. Против исте се може покренути управни спор пред Управним судом у року од 30 дана од дана његовог уручења.

- Достављено:
- Подносиоцу захтева
 - Инспекцији
 - Архиви

ДРЖАВНИ СЕКРЕТАР

Др Миладин Аврамов

