



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ



Биолошки потенцијал врсте
***Schizophyllum commune* Fries 1815. из**
потопљене културе у биопрајмингу
семена грашка (*Pisum sativum* L.)

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментори:

проф. др Маја Караман

др Гордана Таминцић

Кандидат:

MSc Јована Мишковић

Нови Сад, 2023. године

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Јована Мишковић
Ментори (титула, име, презиме, звање, институција)	др Маја Караман, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду др Гордана Таминчић, виши научни сарадник, Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад
Наслов рада:	„Биолошки потенцијал врсте <i>Schizophyllum commune</i> Fries 1815. из потопљене културе у биопрајмингу семена грашка (<i>Pisum sativum</i> L.)“
Језик публикације (писмо):	Српски (ћирилица)
Физички опис рада:	Унети број: Страница <u>321</u> Поглавља <u>8</u> Референци <u>384</u> Табела <u>14</u> Слика <u>24</u> Графикона <u>20</u> Прилога <u>1</u>
Научна област:	Биологија
Ужа научна област (научна дисциплина):	Микробиологија/Микологија
Кључне речи / предметна одредница:	<i>Schizophyllum commune</i> , <i>Pisum sativum</i> , биопрајминг, антиоксидативна активност, полисахариди
Резиме на језику рада:	Биопрајминг семена представља напредну технику третмана семена која обезбеђује повећану клијавост и отпорност семена на стрес путем интеграције биолошких и физичких аспеката биоагенаса, укључујући корисне микроорганизме и њихове продукте. Са друге стране,

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

истраживање филаментозних гљива су допринела сазнањима о огромном потенцијалу ових организама у биотехнолошким процесима, а све више је израженија и свест о способности гљива да повећају отпорност биљака на различите услове стреса, што би значајно допринело повећању производње и одрживости пољопривреде. Познато је да врста *Schizophyllum commune* Fries 1815. синтетише многе корисне метаболите, укључујући и полисахарид (ПХ) шизофилан који је нашао примену у многим индустријама, услед чега је циљ докторске дисертације био испитивање потенцијала ове врсте у биопрајмингу семена грашка (*Pisum sativum* L.). Први део истраживања је укључивао култивацију два различита соја гљиве *S. commune* Fr. пореклом из Србије (СРБ) и Италије (ИТА) у потопљеној култури током 7, 14, 21 и 28 дана, а затим и припрему и карактеризација различитих екстраката (етанолних – ЕТ, метанолних и полисахаридних – ПСХ) из биомасе и филтрата. Серија *in vitro* есеја је коришћена за испитивање антиоксидативне, антибактеријске и антиацетилхолинестеразне активности у циљу одабира најпотентнијих екстраката. Резултати прве фазе су значајно допринели разумевању утицаја типа растварача, типа екстракта, методе екстракције и дужине инкубационог периода на јачину испитиваних активности и указали на синергистички ефекат примарних и секундарних метаболита, што је имало велики значај у одабиру екстраката за наставак истраживања. Штавише, прикупљени подаци су обезбедили детаљан увид у различите активности и биохемијске карактеристике екстраката и на тај начин омогућили идентификацију најпотентнијих екстраката у контексту биопрајминга, али и наговестили потенцијал примене у фармакологији. Прелиминарним биопрајмингом семена грашка започет је други део истраживања, где су детаљно проучени ефекти ПСХ и ЕТ екстраката гљиве на параметре квалитета семена грашка и почетног пораста биљака. Будући да ЕТ екстракти нису произвели значајне резултате који би били примењиви у пољопривредној пракси, истраживање се фокусирао на карактеризацију и примену ПСХ екстраката, конкретно егзо (ЕПСХ) и интраполисахарида (ИПСХ) у биопрајмингу. Последња фаза истраживања обухватала је биопрајминг семена грашка са изолованим ЕПСХ и ИПСХ из СРБ и ИТА сојева гљиве, испитивање квалитета семена и почетног пораста биљака након биопрајминга под оптималним условима и у условима стреса односно суше, као и анализу ензимске и неензимске антиоксидативне активности и хемијску карактеризацију екстраката грашка.

Позитиван утицај ПХ на енергију клијања и клијавост семена грашка, као и значајно побољшање испитиваних параметара у условима стреса (суше) наговештавају да примена ПХ из *S. commune* Fr. у биопрајмингу има дугорочне користи за развој биљака, и може значајно да допринесе стимулисању ране фазе развоја и увећање биомасе и приноса у каснијим фазама развоја грашка. Испитивања антиоксидативне активности као и хемијска карактеризација екстраката грашка су значајно допринела сазнањима о утицају биопрајмингу семена на одбранбени механизам биљке у оптималним условима и условима суше. Додатно резултати су указали на огроман потенцијал ПХ изолованих из гљиве *S. commune* Fr. као антиоксиданаса што има значајне последице на наше разумевање одговора биљака на стресне услове и за разраду стратегија које могу помоћи у заштити биљака. Битно је напоменути да су резултати пионирски и да наглашавају значај интеграције гљива и њихових метаболита у

	еколошки одрживу пољопривредну праксу, што даље може имати значајне импликације за унапређење производње грашка.
Датум прихватања теме од стране надлежног већа:	16.09.2021.
Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	Председник: др Милан Боришев, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Члан: др Маја Караман, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Члан: др Гордана Таминџић, виши научни сарадник, Институт за ратарство и повртарство Члан: др Милена Рашета, научни сарадник, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду Члан: др Гордана Гојгић – Цвијовић, научни саветник, Институт за хемију, технологију и металургију, Универзитет у Београду
Напомена:	

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Jovana Mišković
Supervisors (title, first name, last name, position, institution)	Dr. Maja Karaman, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Dr. Gordana Tamindžić, senior research associate, Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad
Thesis title:	„Biological potential of <i>Schizophyllum commune</i> Fries 1815 species from submerged culture in pea (<i>Pisum sativum</i> L.) seed biopriming “
Language of text (script):	Serbian language (<u>cyrillic</u>)
Physical description:	Number of: Pages <u>321</u> Chapters <u>8</u> References <u>384</u> Tables <u>14</u> Illustrations <u>24</u> Graphs <u>20</u> Appendices <u>1</u>
Scientific field:	Biology
Scientific subfield (scientific discipline):	Microbiology/Mycology
Subject, Key words:	<i>Schizophyllum commune</i> , <i>Pisum sativum</i> , biopriming, antioxidant activity, polysaccharides
Abstract in English language:	Seed biopriming is an advanced seed treatment technique that provides increased germination and seed resistance to stress through the integration of biological and physical aspects of bioagents, including beneficial microorganisms and their products. On the other hand, the research of filamentous fungi has contributed to the knowledge about the enormous potential of these organisms in biotechnological processes, and the awareness

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

5б – Statement on the authority,

5в – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>of the ability of fungi to increase the resistance of plants to various stress conditions, which would significantly contribute to the increase in production and the sustainability of agriculture, is becoming more pronounced. It is known that the species <i>Schizophyllum commune</i> Fries 1815 synthesizes many useful metabolites, including the polysaccharide (PH) schizophyllan, which has found application in many industries. Hence, the aim of the doctoral dissertation was to examine the potential of this species in the biopriming of pea seeds (<i>Pisum sativum</i> L.) . The first part of the research included the cultivation of two different strains of the mushroom <i>S. commune</i> Fr. originating from Serbia (SRB) and Italy (ITA) in submerged culture for 7, 14, 21 and 28 days, and then the preparation and characterization of different extracts (ethanolic - ET, methanolic and polysaccharide - PSH) from biomass and filtrate. A series of <i>in vitro</i> assays was used to examine antioxidant, antibacterial and antiacetylcholinesterase activity in order to select the most potent extracts. The results of the first phase significantly contributed to the understanding of the influence of the type of solvent, the type of extract, the extraction method and the length of the incubation period on the strength of the tested activities and indicated the synergistic effect of primary and secondary metabolites, which was of great importance in the selection of extracts for further research. Moreover, the collected data provided a detailed insight into the various activities and biochemical characteristics of the extracts and thus enabled the identification of the most potent extracts in the context of biopriming, but also hinted at the potential of application in pharmacology. The second part of the research was started with the preliminary biopriming of pea seeds, where the effects of PSH and ET mushroom extracts on parameters of pea seed quality and initial plant growth were studied in detail. Since ET extracts did not produce significant results that would be applicable in agricultural practice, research focused on the characterization and application of PSH extracts, specifically exo (EPSH) and intrapolysaccharide (IPSH) in biopriming. The last phase of the research included biopriming of pea seeds with isolated EPSH and IPSH from SRB and ITA mushroom strains, examination of seed quality and initial plant growth after biopriming under optimal conditions and under conditions of stress or drought, as well as analysis of enzymatic and non-enzymatic antioxidant activity and chemical characterization pea extract. The positive effect of PH on the germination energy and germination of pea seeds, as well as the significant improvement of the tested parameters under stress (drought) conditions, indicate that the application of PH from <i>S. commune</i> Fr. in biopriming has long-term benefits for plant development, and can significantly contribute to the stimulation of the early stage of development and the increase of biomass and yield in the later stages of development. Tests of antioxidant activity as well as chemical characterization of pea extracts significantly contributed to knowledge about the impact of seed biopriming on the plant's defense mechanism in optimal and drought conditions. In addition, the results indicated the enormous potential of PH isolated from this mushroom as antioxidants, which has significant consequences for our understanding of plant responses to stress conditions and for the development of strategies that can help protect plants. It is important to note that the results are pioneering and emphasize the importance of integrating fungi and their metabolites into ecologically sustainable agricultural practices, which may further have significant implications for the improvement of pea production.</p>
Accepted on Scientific Board on:	16.9.2021

Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Dr. Milan Borišev, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Member: Dr. Maja Karaman, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Member: Dr. Gordana Tamindžić, senior research associate, Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad Member: Dr. Milena Rašeta, research associate, Faculty of Sciences, University of Novi Sad Member: Dr. Gordana Gojgić-Cvijović, principal research fellow, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, University of Belgrade
Note:	

Желела бих да искористим ову прилику да искажем своју дубоку захвалност свима који су допринели изради овог рада. Ваша неизмерна подршка, савети, инспирација и стрпљење су ме довели до успешног завршетка докторских студија.

Пре свега, желим да се захвалим својим менторима проф. др Маји Караман, редовном професору на Департману за биологију и екологију Природно-математичког факултета и др Гордани Таминџић, вишем научном сараднику на Институту за ратарство и повртарство, Нови Сад. Њихова стручност и подршка су ме извели на прави пут и били кључни за мој академски напредак.

Професорки Маји Караман дугујем неизмерну захвалност, на бескрајном стрпљењу, искреној пожртвованости и искусном вођењу кроз читав процес истраживања. Захваљујем се на стручним и пријатељским саветима, подршци, као и инспирацији коју сте ми пружили током свих ових година. Били сте и остали велики ослонац током мог професионалног развоја. Без Ваше експертизе, професионалности, доброте и посвећености ово достигнуће не би било могуће.

Желим да изразим дубоку захвалност др Гордани Таминџић на огромној посвећености, неуморном и искусном вођењу овог истраживачког процеса и изузетно корисним препорукама. Велико хвала што сте ме примили у своју лабораторију и указали ми драгоцену подршку, разумевање и стрпљење. Захваљујући Вашим стручним и пријатељским саветима, као и доброј намери успела сам да превазиђем све изазове и остварим свој циљ.

Такође, овим путем бих желела да се захвалим и члановима комисије, др Милени Рашети, др Милану Боришеву и др Гордани Гојгић-Цвијовић.

Неизмерно хвала др Милени Рашети, научном сараднику на Департману за хемију, биохемију и заштиту животне средине, на огромној подршци, искреној сарадњи, пријатељском духу, размени идеја, охрабривању, као и свим упутствима током писања докторске тезе. Хвала на непроцењивој помоћи у лабораторији и ван ње, која ми је значајно олакшала и убрзала експериментални део и улепшала путовање кроз академски свет.

Велико хвала др Милану Боришеву, ванредном професору на Департману за биологију и екологију на вредним коментарима и сугестијама које су значајно унапредили квалитет мог рада.

Хвала др Гордани Гојгић-Цвијовић, научном саветнику на Институту за хемију, технологију и металургију, Универзитета у Београду што ме је несебично примила у своју лабораторију, као и на помоћи и подршци током хемијских анализа екстраката. Ваши вредни савети и конструктивне критике су допринеле унапређењу мог истраживачког рада.

Захваљујем се и својим драгим колегама и пријатељима, MSc Ненаду Крсмановићу, др Милани Ракић и др Елеонори Чапељи, на помоћи током извођења појединих експеримената, свим упутствима, предлозима током писања, издвојеном времену, тимском духу и стрпљењу. Ваша сарадња и енергија и дан данас ми много значе.

Хвала мојим професорима др Драгану Радновићу, др Јелици Сименуновић и др Петру Кнежевићу. Хвала и свим осталим колегама са Катедре за микробиологију на сваком осмеху, подрици и помоћи приликом реализације појединих делова експерименталног рада.

*Велико хвала др Маји Игњатов, научном саветнику, и др Слободану Влајићу, научном сараднику на Институту за ратарство и повртарство на издвојеном времену, ангажману око одабира биљног материјала (*Pisum sativum* L.) и спровођењу лабораторијских истраживања, као и корисним саветима.*

Хвала MSc Немањи Живановићу и MSc Сањи Березни са Депармана за хемију, биохемију и заштиту животне средине на несебичној помоћи и подрици око микохемијске карактеризације коришћењем LC-MS/MS процедуре. Хвала драгој Јасмини Ердеи Поповић, техничком сараднику са Катедре за биохемију и хемију природних производа на драгоцену помоћи у лабораторији.

Хвала др Драгици Јаковљевић, научном саветнику на Институту за хемију, технологију и металургију, Универзитета у Београду на великох подрици и помоћи око FTIR анализе.

Дубоку захвалност дугујем својој породици и пријатељима који су ме бодрили све ове године. Пре свега, хвала мојим дивним родитељима, Марији и Кости. Мама и тата, хвала вам на бескрајној љубави, неизмерној подрици и несебичном залагању. Велико хвала што сте увек веровали у мене и омогућили да истрајем до краја, поготово последњих месеци. Без вас не бих била ту где јесам.

Хвала мојој свекрви Јагоди, која ме је подржавала, бодрила и несебично помагала, чак и у најтежим данима. Такође, хвала мом свекру Чеди, највећем борцу кога познајем, на пруженој љубави и подрици.

Посебну захвалност дугујем мом супругу Дамјану и сину Михајлу. Хвала на вашем бескрајном поверењу у мене, несебичној пожртвованости и на томе што увек успевате да ме насмејете. Ваша подршка, љубав и разумевање су ми ветар у леђа и мотивација за будућност.

Докторска теза представља плод заједничког рада и подршке многих, због чега желим да изразим своју захвалност свим људима који су посредно или непосредно били део овог истраживања.

На крају, хвала свима што су веровали у мене.

Нови Сад, 2023

Јована Мишковић

Посвећено мојој породици, а пре свега мом бекану, чија радост и радозналост су ми вечита инспирација. Волим вас изнад свега.

Садржај

РЕЗИМЕ	1
ABSTRACT	3
1. УВОД	5
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	10
2.1. Царство гљива	11
2.1.1. Диверзитет гљива.....	11
2.1.2. Таксономија гљива.....	12
2.1.3. Употреба гљива	16
2.1.4. Екологија гљива	19
2.2. Лигниколне гљиве	21
2.2.1. Гљиве беле трулежи.....	23
2.3. Phylum Basidiomycota	30
2.4. Род (Genus) <i>Schizophyllum</i>	31
2.4.1. Врста (Species) <i>Schizophyllum commune</i>	35
2.4.1.1. Биолошке активности врсте <i>S. commune</i> Fr.....	37
2.4.1.2. Микохемијски састав врсте <i>S. commune</i> Fr.....	40
2.4.1.2.1. Примарни метаболити	40
Шизофилан	41
Структура и производња шизофилана	41
Биолошке активности и примена шизофилана	44
2.4.1.2.2. Секундарни метаболити	45
2.5. Потопљене културе гљива	47
2.6. Климатске промене и суша	50

2.6.1. Одбрамбени механизми биљака у стресним условима суше.....	51
2.7. Грашак (<i>Pisum sativum</i> L.).....	54
2.8. Квалитет семена	57
2.9. Третман семена	58
2.9.1. Прајминг	58
2.9.2. Биопрајминг.....	65
3. ЦИЉ РАДА.....	67
4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО ИСТРАЖИВАЊА	69
4.1. Молекуларна идентификација врсте – ITS секвенционирање	71
4.2. Припрема екстраката гљиве <i>S. commune</i> Fr.	72
4.2.1. Изолација мицелије и гајење у потопљеним културама.....	72
4.2.2. Припрема етанолних и метанолних екстраката	73
4.2.3. Припрема полисахаридних екстраката	74
4.3. Детерминација антиоксидативне активности гљиве	74
4.3.1. Детерминација капацитета „хватања“ DPPH радикала.....	75
4.3.2. Детерминација капацитета „хватања“ ABTS радикала.....	75
4.3.3. Детерминација капацитета „хватања“ OH радикала	76
4.3.4. Детерминација капацитета „хватања“ супероксид анјон радикала.....	76
4.3.5. Детерминација капацитета „хватања“ NO радикала	77
4.3.6. Детерминација редукционог потенцијала применом FRAP теста	77
4.4. Детерминација антимикробне активности гљиве	78
4.4.1. Детерминација антибактеријске активности екстраката гљиве	78

4.5. Детерминација анти-ацетилхолинестеразне активности	
гљиве	79
4.6. Микохемијска карактеризација гљиве.....	81
4.6.1. FTIR анализа.....	81
4.6.2. Хидролиза	81
4.6.3. Детерминација садржаја укупних протеина.....	81
4.6.4. Детерминација садржаја угљених хидрата.....	82
4.6.5. Детерминација садржаја укупних фенола	82
4.6.6. LC-MS/MS анализа	83
4.7. Скрининг и селекција екстраката гљиве за биопрајминг	
семена грашка	84
4.8. Припрема полисахаридних екстраката за биопрајминг – егзо-	
и интраполисахарида	84
4.9. Карактеризација ЕПСХ и ИПСХ.....	86
4.9.1. FTIR анализа.....	86
4.9.2. Елементална органска микроанализа.....	86
4.9.3. Детерминација садржаја протеина	86
4.9.4. Congo red тест.....	87
4.9.5. Скенинг електронска микроскопија	87
4.9.6. NMR анализа	87
4.10. Прајминг семена грашка.....	88
4.11. Испитивање квалитета семена и почетног пораста биљака	
грашка у оптималним условима и условима водног дефицита –	
суше.....	89
4.11.1. Детерминација клијавости семена	89

4.11.2. Детерминација дужине надземног дела и корена биљке и односа корен/надземни део	89
4.11.3. Детерминација масе свежег и сувог надземног дела и корена биљке....	90
4.11.4. Детерминација стопе (брзине) издуживања надземног дела (<i>енг. Shoot Elongation Rate, SER</i>) и корена грашка (<i>енг. Root Elongation Rate, RER</i>).....	90
4.11.5. Детерминација индекса вигора семена	90
4.11.6. Тест пропустљивости електролита.....	91
4.11.7. Детерминација индекса стабилности мембране	91
4.11.8. Детерминација релативног садржаја воде	92
4.11.9. Детерминација индекса толерантности грашка на стрес, индекса толеранције надземног дела изданака на стрес и индекса толеранције корена на стрес	93
4.12. Припрема биљних екстраката	93
4.12.1. Припрема екстраката из свеже масе.....	94
4.12.2. Припрема екстраката из суве масе	94
4.13. Детерминација ензимске активности екстраката грашка ...	94
4.13.1. Детерминација активности пирогалол пероксидазе	94
4.13.2. Детерминација активности гвајакол пероксидазе.....	95
4.13.3. Детерминација активности аскорбат пероксидазе.....	96
4.13.4. Детерминација активности каталазе	96
4.14. Детерминација укупног садржаја хлорофила и каротеноида грашка.....	97
4.15. Детерминација антиоксидативне активности екстраката грашка.....	98
4.15.1. Детерминација капацитета „хватања“ DPPH радикала	98
4.15.2. Детерминација капацитета „хватања“ ABTS радикала	98
4.15.3. Детерминација капацитета „хватања“ OH радикала	98

4.15.4. Инхибиција липидне пероксидације	98
4.16. Хемијска карактеризација екстракта грашка	99
4.16.1. Детерминација садржаја протеина	99
4.16.2. Детерминација садржаја укупних фенола	100
4.16.3. Детерминација садржаја флавоноида	100
4.16.4. Детерминација садржаја пролина.....	100
4.16.5. LC-MS/MS анализа	101
4.17. Статистичка обрада података	101
5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА И ДИСКУСИЈА.....	102
5.1. Молекуларна идентификација врсте	103
5.2. Раст гљиве <i>S. commune</i> Fr. у потопљеној култури	105
5.3. Детерминација антиоксидативне активности гљиве	106
5.3.1. Антирадикалска активност екстракта гљиве	106
5.3.1.1. Капацитет „хватања“ DPPH радикала.....	106
5.3.1.2. Капацитет „хватања“ ABTS радикала.....	107
5.3.1.3. Капацитет „хватања“OH [•] радикала	109
5.3.1.4. Капацитет„хватања“ O ₂ ⁻ радикала	109
5.3.1.5. Капацитет „хватања“ NO [•] радикала.....	110
5.3.2. Редукциони потенцијал екстракта гљиве.....	111
5.4. Детерминација антимикробне активности гљиве	113
5.4.1. Детерминација антибактеријске активности екстракта гљиве	113
5.5. Детерминација анти-ацетилхолинестеразне активности гљиве	116
5.6. Хемијска карактеризација гљиве	119
5.6.1. FTIR анализа.....	119

5.6.1.1. Етанолни екстракти	119
5.6.1.2. Полисахаридни екстракти	120
5.6.2. Одређивање садржаја укупних протеина	121
5.6.3. Одређивање садржаја угљених хидрата	122
5.6.4. Детерминација садржаја укупних фенола	123
5.6.5. LC-MS/MS анализа	123
5.7. Скрининг и селекција екстраката гљиве за биопрајминг семена грашка	126
5.8. Карактеризација егзо и интраполисахарида	127
5.8.1. FTIR анализа са микроанализом и укупним садржајем протеина	127
5.8.2. Congo red тест.....	127
5.8.3. Скенинг електронска микроскопија (SEM).....	129
5.8.4. NMR анализа	133
5.9. Испитивање квалитета семена и почетног пораста биљака повртарског грашка након биопрајминга полисахаридима у оптималним условима и условима водног дефицита – суше	137
5.9.1. Корелациона анализа	150
5.10. Детерминација антиоксидативне активности екстраката грашка.....	155
5.10.1. Детерминација ензимске активности	155
5.10.2. Детерминација неензимске активности	157
5.10.2.1. Детерминација капацитета „хватања“ DPPH и ABTS радикала и FRAP анализа.....	157
5.10.2.2. Детерминација капацитета „хватања“ OH• радикала и инхибиција липидне пероксидације.....	161
5.11. Хемијска карактеризација екстраката грашка	163

5.11.1. Детерминација укупног садржаја хлорофила грашка	163
5.11.2. Детерминација укупног садржаја протеина	166
5.11.3. Детерминација садржаја пролина.....	168
5.11.4. Детерминација садржаја укупних фенола и флавоноида	169
5.11.5. LC-MS/MS анализа	176
5.11.6. Мултиваријациона анализа	181
6. ЗАКЉУЧАК.....	187
7. РЕФЕРЕНЦЕ.....	192
8. ПРИЛОГ.....	214
8.1. Раст гљиве <i>S. commune</i> Fr. у потопљеној култури.....	215
8.2. Одређивање антирадикалске активности и редукционог потенцијала екстраката	216
8.2.1. Детерминација капацитета „хватања“ $O_2 \cdot^-$ радикала	219
8.2.2. Неутрализација <i>NO</i> радикала.....	228
8.2.3. Неутрализација <i>ABTS</i> радикала	233
8.2.4. Детерминација редукционог потенцијала (<i>FRAP</i> есеј)	240
8.2.5. Детерминација укупних фенола	247
8.2.6. Детерминација капацитета „хватања“ <i>DPPH</i> радикала	253
8.2.7. Инхибиција липидне пероксидације	271
8.3. Детерминација антимицробне активности	276
8.4. Детерминација антиацетилхолинестеразне активности.....	277
8.5. Хемијска карактеризација	278
8.5.1. <i>FTIR</i> анализа екстраката врсте <i>S. commune</i> Fr.	278
8.5.2. <i>FTIR</i> анализа <i>ЕПСХ</i> и <i>ИПСХ</i> изолованих из врсте <i>S. commune</i> Fr.	279
8.5.3. Укупан садржај протеина и угљених хидрата	280
8.5.4. <i>LC-MS/MS</i> анализа	287
8.5.5. <i>Congo red</i> тест	300
8.5.6. Детерминација укупног садржаја флавоноида у метанолним екстрактима грашка <i>Pisum sativum</i> L.	302
8.5.7. Детерминација садржаја пролина	305
8.5.8. Елементална органска микроанализа	308

8.5.9. <i>NMR</i> анализа.....	308
8.6. Скрининг полисахаридних и етанолних екстраката гљиве за биопрајминг семена грашка	312
8.7. Испитивање ензимске активности екстраката	315

Листа табела

Табела 1. Упоредивање одређених особина гљива са особинама биљака и животиња (Deacon, 2005)

Табела 2. Одобрени и примењени патенти врсте *S. commune* Fr.

Табела 3. Преглед испитиваних биолошких активности врсте *S. commune* Fr. у последњих 10 година

Табела 4. Састав ферментационог медијума

Табела 5. Упоредни приказ капацитета „хватања“ DPPH и ABTS радикала полисахаридних (ПСХ) и етанолних (ЕТ) екстраката врсте *S. commune* Fr.

Табела 6. Одређене концентрације одабраних фенолних једињења LC-MS/MS техником у испитиваним ПСХ и ЕТ екстрактима ($\mu\text{g/g}$ с.м.).

Табела 7. Двофакторијална анализа варијансе параметара квалитета повртарског грашка након биопрајминга полисахаридима изолованих из гљиве *S. commune* Fr. у оптималним условима и у условима стреса суше

Табела 8. Ефекат биопрајминга полисахаридима изолованих из *S. commune* Fr. на дужину надземног дела и корена биљке грашка, свежу и суву масу надземног дела и корена изданака и вигор индекс у оптималним условима и стресним условима (суша)

Табела 9. Ефекат биопрајминга полисахаридима изолованих из *S. commune* Fr. на стопу издуживања надземног дела, стопу издуживања корена, однос корен/надземни део, индекс стабилности мембране и пропустљивост електролита у оптималним условима и стресним условима (суша)

Табела 10. Ефекат биопрајминга полисахаридима изолованих из *S. commune* Fr. на релативан садржај воде, индекс толерантности на сушу, индекс толерантности надземног дела изданака на стрес и индекс толерантности корена изданака на стрес у оптималним условима и стресним условима (суша)

Табела 11. Ензимска активност испитиваних екстраката грашка након третмана полисахаридима гљива

Табела 12. Упоредни преглед неутрализације DPPH и ABTS радикала и редукциони потенцијал екстраката грашка након третмана полисахаридима гљиве у оптималним условима и условима водног дефицита – суше

Табела 13. Укупан садржај фенола и флавоноида у екстрактима грашка након биопрајминга семена грашка са полисахаридима гљиве у оптималним условима и условима стреса (суша)

Табела 14. Одређене концентрације одабраних фенолних једињења LC-MS/MS техником у испитиваним МЕ екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима пореклом из гљиве *S. commune* Fr. (ng/mg с.м.)

Листа хистограма

Хистограм 1. Упоредни приказ прираста биомасе у потопљеној култури врсте *S. commune* Fr. – ИТА и СРБ сој

Хистограм 2. Графички приказ антирадикалске активности ЕТ екстраката врсте *S. commune* Fr. против ОН[•]радикала

Хистограм 3. Графички приказ антирадикалске активности ЕТ екстраката врсте *S. commune* Fr. против О₂^{•-}радикала

Хистограм 4. Графички приказ антирадикалске активности ЕТ екстраката врсте *S. commune* Fr. против NO[•]радикала

Хистограм 5. Упоредни приказ редукционог потенцијала (FRAP метода) етанолних и полисахаридних екстраката СРБ и ИТА соја врсте *S. commune* Fr.

Хистограм 6. МИК и МБК тестираних узорака гљиве *S. commune* Fr.

Хистограм 7. Графички приказ анти-ацетилхолинестеразне активности полисахаридних (А) и етанолних екстраката (Б) СРБ и ИТА соја врсте *S. commune* Fr.

Хистограм 8. Графички приказ ефекта биопрајминга полисахаридима изолованих из гљиве *S. commune* Fr. у оптималним условима на параметре испитивања квалитета семена грашка

Хистограм 9. Графички приказ ефекта биопрајминга полисахаридима изолованих из *S. commune* Fr. у условима стреса (суша) на параметре испитивања квалитета семена грашка

Хистограм 10. Графички приказ неутрализације ОН радикала екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима изолованих из гљиве у оптималним условима и у условима водног дефицита – суше

Хистограм 11. Графички приказ липидне пероксидације екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима изолованих из гљиве у оптималним условима и у условима водног дефицита – суше

Хистограм 12. Графички приказ ефекта биопрајминга полисахаридима изолованих из гљиве *S. commune* Fr. на укупан садржај хлорофила у грашку у оптималним условима

Хистограм 13. Графички приказ ефекта биопрајминга полисахаридима изолованих из гљиве *S. commune* Fr. на укупан садржај хлорофила у грашку у условима стреса (суша)

Хистограм 14. Графички приказ садржаја протеина у екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима изолованих из гљиве у оптималним условима и у условима водног дефицита – суше

Хистограм 15. Графички приказ садржаја пролина у екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима изолованих из гљиве у оптималним условима и у условима водног дефицита – суше

Листа графика

График 1. Компаративни преглед максималне апсорбанце Congo red теста езго- и интраполисахарида код СРБ и ИТА соја врсте *S. commune* Fr.

График 2. РСА анализа ензимске антиоксидативне активности и детектованих фенолних једињења у екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима гљиве у оптималним условима (АМФ – аментофлавон, АПГ – апигенин, ВТ – витексин, ГНС – генистеин, р-КУМ – р-кумаринска киселина, ИЛКР – изоликириритигенин, ЛКР – ликиритигенин, НГ – нарингин, НГН – нарингенин, ПК – протокатехинска киселина, ФН – формононетин, ФК – ферулна киселина)

График 3. РСА анализа неензимске антиоксидативне активности и детектованих фенолних једињења у екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима гљиве у оптималним условима (АМФ – аментофлавон, АПГ – апигенин, ВТ – витексин, ГНС – генистеин, р-КУМ – р-кумаринска киселина, ИЛКР – изоликириритигенин, ЛКР – ликиритигенин, НГ – нарингин, НГН – нарингенин, ПК – протокатехинска киселина, ФН – формононетин, ФК – ферулна киселина)

График 4. РСА анализа ензимске антиоксидативне активности и детектованих фенолних једињења у екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима гљиве у условима стреса (суша) (АМФ – аментофлавон, АПГ – апигенин, ВТ – витексин, ГНС – генистеин, р-КУМ – р-кумаринска киселина, ИЛКР – изоликириритигенин, ЛКР – ликиритигенин, НГ – нарингин, НГН – нарингенин, ПК – протокатехинска киселина, ФН – формононетин, ФК – ферулна киселина)

График 5. РСА анализа неензимске антиоксидативне активности и детектованих фенолних једињења у екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима гљиве у условима стреса (суша) (АМФ – аментофлавон, АПГ – апигенин, ВТ – витексин, ГНС – генистеин, р-КУМ – р-кумаринска киселина, ИЛКР – изоликириритигенин, ЛКР – ликиритигенин, НГ – нарингин, НГН – нарингенин, ПК – протокатехинска киселина, ФН – формононетин, ФК – ферулна киселина)

Листа слика

Слика 1. Шематски приказ разградње лигнина од стране гљива беле трулежи које припадају разделу Basidiomycota

Слика 2. Мапа распрострањења врста *S. radiatum* Fr. (А), *S. umbrinum* Berk. (Б), *S. fasciatum* Pat. (В), *S. leprieuri* Linder (Г), *S. palmatum* Jungh. ex W.B. Cookey (Д) и *S. amplum* (Lev.) Nakasoney (Ђ)

Слика 3. *S. commune* Fr.

Слика 4. Мапа распрострањења врста *S. commune* Fr.

Слика 5. Структура шизофилана

Слика 6. Шематски приказ повезаности примарног и секундарног метаболизма код гљива

Слика 7. Потопљена култивација врсте *S. commune* Fr.

Слика 8. Криве имбибиције семена и фазе клијања семена у непрајмингованом и прајмингованом семену

Слика 9. Компаративни преглед потенцијала толеранције стреса на сушу код биљака чије је семе подвргнуто прајмингу и код нетретираних биљака

Слика 10. Шематски приказ припреме екстракта ЕПСХ и ИПСХ

Слика 11. Филогенетско стабло

Слика 12. FTIR спектри испитиваних ПСХ екстракта изолованих из *S. commune* Fr.; А – Ф, 14 дана, ИТА; В – БМ, 14 дана ИТА; С – БМ, 14 дана СРБ; Д – Ф, 28 дана, СРБ.

Слика 13. СЕМ микрографија ЕПСХ изолованог из ИТА соја врсте *S. commune* Fr. – лиофилизиран узорак, увећање 500 и 1000 пута

Слика 14. СЕМ микрографија ЕПСХ изолованог из ИТА соја врсте *S. commune* Fr. –узорак сушен на ваздуху, увећање 500 и 1000 пута

Слика 15. СЕМ микрографија ЕПСХ изолованог из СРБ соја врсте *S. commune* Fr.– лиофилизиран узорак, увећање 100 и 500 пута

Слика 16. СЕМ микрографија ЕПСХ изолованог из СРБ соја врсте *S. commune* Fr. –узорак сушен на ваздуху, увећање 500 и 1000 пута

Слика 17. С13 спектар ензимски третираног узорка ИПСХ СРБ

Слика 18. NMR спектар узорка ИПСХ СРБ у региону 0-10ppm

Слика 19. NMR спектар узорка ЕПСХ СРБ у региону 0-10 ppm

Слика 20. NMR спектар узорка ЕПСХ ИТА у региону 0-10 ppm

Слика 21. NMR спектар ензимски третираног узорка ЕПСХ ИТА у региону 2,8-4,8 ppm

Слика 22. Топлотна мапа заснована на корелационој анализи испитиваних параметара повртарског грашка. А) Оптимални услови; Б) Суша

Слика 23. Топлотна мапа базирана на корелационој анализи испитане антиоксидативне активности и хемијске карактеризације екстракта грашка – оптимални услови

Слика 24. Топлотна мапа базирана на корелационој анализи испитане антиоксидативне активности и хемијске карактеризације екстракта грашка – суша

Листа скраћеница

4-HNE– 4-хидрокси-2-хексенал	RSC– <i>енг.</i> Radical Scavenging Capacity
AChE – ацетилхолинестераза	RWC – <i>енг.</i> Relative Water Content
aPX – аскорбат пероксидаза	SNP– натријум нитропрусида
BSA – <i>енг.</i> Bovin Serum Albumin	ТВА– тиобарбитуратна киселина
CAT – каталаза	ТВА – тиобарбитурна киселина
CFU – <i>енг.</i> Colony Forming Units	TPTZ – гвожђе (II)-2,4,5-трипиридил-S-триазин
DMSO – диметилсулфоксид	ABTS – <i>енг.</i> 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
DPPH– 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил	АК– аскорбинска киселина
DSS– натријум-2,2-диметил-2-силапентан-5-сулфонат	АТ – атипични изданци
DTNB– 5,5' дитиобис-2-нитробензоевом киселином	БМ – биомаса
FC– Folin-Ciocalteu реагенс	ГК – гална киселина
FRAP– <i>енг.</i> Ferric Reducing Antioxidant Power Assay	ГЛУ – глюкоза
gPX – гвајакол пероксидаза	Д – дан/дани
HNE– 4-хидрокси-2-ноненал	ДК – дужина корена
MDA – малондиалдехид	ДНД – дужина надземног дела
MDA– малондиалдехид	ЕК – енергија клијања
NBT – нитроблу-тетразолијум	ЕК– енергија клијања
NCBI– <i>енг.</i> National Center for Biotechnology Information	ЕПСХ – езгополисахариди
O ₂ • ⁻ – супероксид ањон радикала	ЕТ – етанолни
ОН – хидроксил радикал	ИВИ– вигор индекс
PCA – <i>енг.</i> principal component analysis	ИПСХ – интраполисахариди
PG – пирогалол	ИСМ– индекс стабилности мембране
PMS– феназинметилсулфата	ИТА – Италија
pPX – пирогалол пероксидаза	ИТК– индекс толеранције дужине (пораста) корена на стрес
Pro– L-пролин	ИТКС– индекс толеранције корена на стрес
ROS – <i>енг.</i> Reactive Oxygen Species	

ИТН– индекс толеранције дужине (пораста) надземног дела изданака на стрес

ИТНС– индекс толеранције надземног дела изданака на стрес

ИТС– индекс толерантности на сушу

К – контрола

КЛ– клијавост семена

МЕ – метанолни екстракти

МНА – Müller-Hinton агар

МНВ – Müller-Hinton бујон

МБК – минимална бактерицидна концентрација

МИК – минимална инхибиторна концентрација

ОКН– однос корен/надземни део

ПЕ – пропустљивост електролита

ПЕГ– полиетилен гликол

ПСХ – полисахаридни екстракти

РСВ – релативан садржај воде

СВИ– индекс вигора (или виталности) семена

СВК– свежа маса корена изданака

СВН – свежа маса надземног дела изданака

СД – стандардна девијација

СЕМ – скенинг електронска микроскопија

СИК– стопа издуживања корена

СИН– стопа издуживања надземног дела

СРБ – Србија

СУК– сува маса корена изданака

СУН– сува маса надземног дела изданака

Ф – филтрат

ХП – хидропрајминг

РЕЗИМЕ

Биопрајминг семена представља напредну технику третмана семена која обезбеђује повећану клијавост и отпорност семена на стрес путем интеграције биолошких и физичких аспеката биоагенаса, укључујући корисне микроорганизме и њихове продукте. Са друге стране, истраживање филаментозних гљива су допринела сазнањима о огромном потенцијалу ових организама у биотехнолошким процесима, а све више је израженија и свест о способности гљива да повећају отпорност биљака на различите услове стреса, што би значајно допринело повећању производње и одрживости пољопривреде. Познато је да врста *Schizophyllum commune* Fries 1815. синтетише многе корисне метаболите, укључујући и полисахарид (ПХ) шизофилан који је нашао примену у многим индустријама, услед чега је циљ докторске дисертације био испитивање потенцијала ове врсте у биопрајмингу семена грашка (*Pisum sativum* L.). Први део истраживања је укључивао култивацију два различита соја гљиве *S. commune* Fr. пореклом из Србије (СРБ) и Италије (ИТА) у потопљеној култури током 7, 14, 21 и 28 дана, а затим и припрему и карактеризација различитих екстраката (етанолних – ЕТ, метанолних и полисахаридних – ПСХ) из биомасе и филтрата. Серија *in vitro* есеја је коришћена за испитивање антиоксидативне, антибактеријске и антиацетилхолинестеразне активности у циљу одабира најпотентнијих екстраката. Резултати прве фазе су значајно допринели разумевању утицаја типа растварача, типа екстракта, методе екстракције и дужине инкубационог периода на јачину испитиваних активности и указали на синергистички ефекат примарних и секундарних метаболита, што је имало велики значај у одабиру екстраката за наставак истраживања. Штавише, прикупљени подаци су обезбедили детаљан увид у различите активности и биохемијске карактеристике екстраката и на тај начин омогућили идентификацију најпотентнијих екстраката у контексту биопрајминга, али и наговестили потенцијал примене у фармакологији. Прелиминарним биопрајмингом семена грашка започет је други део истраживања, где су детаљно проучени ефекти ПСХ и ЕТ екстраката гљиве на параметре квалитета семена грашка и почетног пораста биљака. Будући да ЕТ екстракти нису произвели значајне резултате који би били примењиви у пољопривредној пракси,

истраживање се фокусирао на карактеризацију и примену ПСХ екстраката, конкретно егзо (ЕПСХ) и интраполисахарида (ИПСХ) у биопрајмингу. Последња фаза истраживања обухватала је биопрајминг семена грашка са изолованим ЕПСХ и ИПСХ из СРБ и ИТА сојева гљиве, испитивање квалитета семена и почетног пораста биљака након биопрајминга под оптималним условима и у условима стреса односно суше, као и анализу ензимске и неензимске антиоксидативне активности и хемијску карактеризацију екстраката грашка.

Позитиван утицај ПХ на енергију клијања и клијавост семена грашка, као и значајно побољшање испитиваних параметара у условима стреса (суше) наговештавају да примена ПХ из *S. commune* Fr. у биопрајмингу има дугорочне користи за развој биљака, и може значајно да допринесе стимулсању ране фазе развоја и увећање биомасе и приноса у каснијим фазама развоја грашка. Испитивања антиоксидативне активности као и хемијска карактеризација екстраката грашка су значајно допринела сазнањима о утицају биопрајмингу семена на одбранбени механизам биљке у оптималним условима и условима суше. Додатно резултати су указали на огроман потенцијал ПХ изолованих из гљиве *S. commune* Fr. као антиоксиданаса што има значајне последице на наше разумевање одговора биљака на стресне услове и за разраду стратегија које могу помоћи у заштити биљака. Битно је напоменути да су резултати пионирски и да наглашавају значај интеграције гљива и њихових метаболита у еколошки одрживу пољопривредну праксу, што даље може имати значајне импликације за унапређење производње грашка.

ABSTRACT

Seed biopriming is an advanced seed treatment technique that provides increased germination and seed resistance to stress through the integration of biological and physical aspects of bioagents, including beneficial microorganisms and their products. On the other hand, the research of filamentous fungi has contributed to the knowledge about the enormous potential of these organisms in biotechnological processes, and the awareness of the ability of fungi to increase the resistance of plants to various stress conditions, which would significantly contribute to the increase in production and the sustainability of agriculture, is becoming more pronounced. It is known that the species *Schizophyllum commune* Fries 1815 synthesizes many useful metabolites, including the polysaccharide (PH) schizophyllan, which has found application in many industries. Hence, the aim of the doctoral dissertation was to examine the potential of this species in the biopriming of pea seeds (*Pisum sativum* L.). The first part of the research included the cultivation of two different strains of the mushroom *S. commune* Fr. originating from Serbia (SRB) and Italy (ITA) in submerged culture for 7, 14, 21 and 28 days, and then the preparation and characterization of different extracts (ethanolic - ET, methanolic and polysaccharide - PSH) from biomass and filtrate. A series of *in vitro* assays was used to examine antioxidant, antibacterial and antiacetylcholinesterase activity in order to select the most potent extracts.

The results of the first phase significantly contributed to the understanding of the influence of the type of solvent, the type of extract, the extraction method and the length of the incubation period on the strength of the tested activities and indicated the synergistic effect of primary and secondary metabolites, which was of great importance in the selection of extracts for further research. Moreover, the collected data provided a detailed insight into the various activities and biochemical characteristics of the extracts and thus enabled the identification of the most potent extracts in the context of biopriming, but also hinted at the potential of application in pharmacology. The second part of the research was started with the preliminary biopriming of pea seeds, where the effects of PSH and ET mushroom extracts on parameters of pea seed quality and initial plant growth were studied in detail. Since ET extracts did not produce significant results that would be applicable in agricultural practice, research focused on the characterization and

application of PSH extracts, specifically exo (EPSH) and intrapolysaccharide (IPSH) in biopriming. The last phase of the research included biopriming of pea seeds with isolated EPSH and IPSH from SRB and ITA mushroom strains, examination of seed quality and initial plant growth after biopriming under optimal conditions and under conditions of stress or drought, as well as analysis of enzymatic and non-enzymatic antioxidant activity and chemical characterization pea extract. The positive effect of PH on the germination energy and germination of pea seeds, as well as the significant improvement of the tested parameters under stress (drought) conditions, indicate that the application of PH from *S. commune* Fr. in biopriming has long-term benefits for plant development, and can significantly contribute to the stimulation of the early stage of development and the increase of biomass and yield in the later stages of development. Tests of antioxidant activity as well as chemical characterization of pea extracts significantly contributed to knowledge about the impact of seed biopriming on the plant's defense mechanism in optimal and drought conditions. In addition, the results indicated the enormous potential of PH isolated from this mushroom as antioxidants, which has significant consequences for our understanding of plant responses to stress conditions and for the development of strategies that can help protect plants. It is important to note that the results are pioneering and emphasize the importance of integrating fungi and their metabolites into ecologically sustainable agricultural practices, which may further have significant implications for the improvement of pea production.

1. УВОД

У савременом контексту одрживе пољопривредне производње, а у складу са савременим регулативама ЕУ, потреба за иновативним приступима који ће побољшати принос, отпорност и квалитет биљака које се узгајају никада није била већа. Са све већим притиском на смањење употребе агрохемијских средстава у органској производњи и унапређење ефикасности природних ресурса, истраживање алтернативних стратегија које подржавају клијање семена, као и раст и развој биљне културе постаје кључни изазов за науку и индустрију. Последњих година потреба за повећаним квалитетом семена и постизањем брзог и уједначеног ницања садница постала је приоритет с обзиром на суочавање са тренутном потражњом за високим стандардима на пољопривредном тржишту (Global GAP, GRASP и др.). Потрошачи су забринуте и за сигурност хране с обзиром на честу примену синтетичких пестицида на усевама (Shaffique *u cap.*, 2022).

Потреба за развојем одрживих и еколошки прихватљивих система усева и за заменом хемикалија из пољопривредне производње, као и промене климатских фактора као стресних услова за нормалан раст, довела је до растуће потражње за природним производима за контролу развоја патогена (бактерија, гљива) у биљкама и побољшањем приноса и квалитета семена. Штавише, створена је потреба за новим истраживањима која подржавају развој еколошки прихватљивих производа кроз промоцију одрживих пољопривредних пракси. Стога, биопрајминг семена, као техника која користи живе микроорганизме или њихове екстракте како би побољшала клијавост, раст и отпорност биљке, све више добија на значају.

Савремена истраживања гљива помогла су у расветљавању огромног потенцијала ових организама за развој нових технологија, лекова, хране и козметике и доказала њихово антиоксидативно и антимикробно деловање (Karaman, 2014; Ma *u cap.*, 2018; Karaman, 2019). Филаментозне гљиве су веома значајне у биотехнолошким процесима управо због своје способности да синтетишу бројне метаболите – ензиме, полисахариде, органске киселине, антибиотике и др. Тако је једна од најзначајнијих управо космополитска врста *Schizophyllum commune* (fam. *Schizophyllum*, phylum Basidiomycota), познатија као гљива беле трулежи, која синтетише различите групе метаболита, лигноцелулозне ензиме, полисахарид шизофилан и етанол (Kumar *u cap.*, 2022). Захваљујући производњи

неутралног екстрацелуларног полисахарида шизофилана (β – глукана), ова гљива поседује значајно антигуморско, антиканцерогено и имуномодулаторно деловање, а потврђено је и његово антиинфламаторно дејство (Du и Yang, 2017). Примењује се у преради петролеја, производњи козметичких лосиона, као и кисеоникпермеабилних филмова за очување хране, али најзначајнија је његова примена у фармацији (Zhang *u cap.*, 2013; Mousaviasl *u cap.*, 2018).

Шизофилан се може екстраховати из плодног тела, мицелије или ферментационог медијума из потопљених култура, међутим изолација из прва два извора подразумева врло скупу и компликовану процедуру, због чега се више пажње поклања егзо-шизофилану из медијума, а самим тим и потопљеној култивацији гљиве која га продукује (Shu и Hsu, 2009). Потопљене културе филаментозних гљива представљају биотехнолошки систем производње различитих метаболита великог социјалног и економског значаја, а уједно омогућавају јединствено окружење и способност контроле секреције, а касније и анализу екстрацелуларних метаболита. Додатне предности овакве култивације су свакако аерација и механичко мешање медијума са културом мицелије гљива, као и делимична манипулација производњом метаболита мењањем фактора средине приликом култивације (састав подлоге, рН, температура, аерација) (Elisashvili, 2012). Поред тога, с обзиром да су гљиве биолошки модулатори имуног одговора код човека и да су полисахариди гљива показали читав спектар нових активности –антимикробна, антивирална и антифунгална, антигуморска и др. (Rathore *u cap.*, 2019), у последње време се препознаје њихов потенцијал да повећају отпорност биљака на широк спектар стресних услова (Cartabia *u cap.*, 2022), што би могло допринети повећању продуктивности и одрживости пољопривредне производње.

Спора стопа клијања биљке често је повезана са неповољним условима животне средине и болестима које се преносе са тла и наносе значајне губитке у приносу, уз смањење естетске вредности и века трајања пољопривредних усева. Протеински грашак, *Pisum sativum* L. (фам. *Fabaceae*) припада зреним махунаркама које чине једну од економски најзначајнијих група усева у светској пољопривреди и једну од основних елемената пољопривреде у Србији јер представља извор протеина за људе и животиње (Mihailović *u cap.*, 2009; Milošević, 2017). Код ове групе биљака квалитет семена има посебан значај због

крупноће семена и сетвене норме, док семе ниског квалитета за последицу има превисоку цене сетве, што доводи до редукције производње протеинског грашка у Србији (Milošević, 2017). Услед огромног значаја и потенцијала ове легуминозе неопходно је побољшати квалитет семена употребом еколошких органских препарата.

Семе подвргнуто „прајмингу” показује повећану стопу клијања што резултира високим нивоом отпорности на биотички и абиотички стрес и већим приносом усева чиме се уједно побољшава и конкурентност производа (Tamindžić *u cap.*, 2021). Биолошки „прајминг“ семена представља напредну и истакнуту технику која се користи за побољшање здравља биљака и толеранције на стрес, а истовремено штити семе од различитих патогена (Ali *u cap.*, 2019). Недавни напредак у коришћењу пољопривредних биостимуланса постепено је отворио пут истраживањима разних ботаничких биостимуланса (појединачна биохемијска супстанца или формулација бројних једињења екстрахованих из органског порекла) како би се појачао раст, развој и/или одбрамбени систем биљака (Pagano *u cap.*, 2023).

Предмет истраживања ове докторске дисертације јесте биохемијска анализа екстраката гљива врсте *S. commune* Fries 1815., култивисаној у потопљеној култури, као и њихова примена у биопрајмингу семена грашка *P. sativum* L. и испитивање утицаја на стопу клијања и квалитет семена грашка, као и на отпорност саме биљке кроз анализу ензимске и неензимске антиоксидативне активности. У оквиру докторске дисертације анализиран је утицај два различита соја гљиве са различитим географским пореклом (Италија и Србија), у циљу компарације активности, с обзиром да различити еколошки фактори могу утицати на продукцију различитих метаболита (Karaman *u cap.*, 2014). Такође, утицај биопрајминга семена грашка екстрактима гљиве је испитан у оптималним условима и у условима суше.

Биопрајминг семена омогућава бољу толеранцију семена на стресне услове због чега је управо ово популарна тема у науци последњих година. Биолошки третман семена грашка са екстрактима гљива није довољно истражен и услед недостатка података, резултати ове докторске дисертације представљају значајан допринос у микологији и физиологији биљака. Са друге стране, *in vitro* анализа активности различитих типова екстраката, хемијска детекција и ензимски есеји пружају нове податке о биолошком потенцијалу

испитиване врсте гљива. Допринос истраживања се огледа и у отварању могућности за примену екстраката и код других врста семена у будућности. Поред тога, резултати докторске дисертације представљају први, али преко потребни, корак ка формирању новог, еколошки прихватљивог, производа на бази полисахаридних екстраката гљива, који би путем биопрајминга позитивно утицао на побољшање квалитета и већу клијавост семена грашка и отпорност биљке, а самим тим и на већи принос. Такође, очекује се да резултати истраживања буду полазна основа за даље анализе са циљем креирања комерцијално доступног и патентабилног производа, што представља огроман значај за одрживу пољопривреду, а уједно и доприноси преласку базичне науке у примењену.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Царство гљива

2.1.1. Диверзитет гљива

Гљиве представљају изузетно интересантну науци и корисну групу организама са значајним биотехнолошким потенцијалом за примењена истраживања и индустријску експлоатацију. Процењује се да постоји преко 1,5 милиона врста гљива широм света, док је до сада описано око 148.000 врста, иако насељавају широк ареал различитих станишта, укључујући и екстремна окружења (Haelewaters *u cap.*, 2022). Процена из 2017. године сугерише постојање између 1,2 и 3,8 милиона врста, с обзиром да се сваке године описује све већи број нових врста (Hawksworth и Lücking, 2017). Недавне студије које су обухватиле целокупан инвентар одређених родова и породица гљива су показале да у земљама и областима које су миколошки таксономисти до сада занемаривали, више од 90% сакупљених примерака може представљати неописане врсте (Wu *u cap.*, 2019). Штавише, пре десетак година број новооткривених врста на годишњем нивоу је порастао са 1.000 на 1.500, док данас годишњи просек индетификовања нових врста износи око 2.000, са рекордним бројем откривених врста у 2020. години (укупно 2.905) (Wang *u cap.*, 2021). Овај тренд пораста новооткривених врста је праћен укључивањем нових молекуларних техника идентификације у таксономију, укључујући и молекуларну филогенију помоћу које су идентификоване многе криптичне врсте (Wu *u cap.*, 2019). Међутим, сазнања о глобалном диверзитету царства гљива и географској дистрибуцији су и даље непотпуна, чак и за описане врсте, с обзиром да се филогенетски односи међу гљивама, посебно раним дивергентним линијама, стално мењају (Wijayawardene *u cap.*, 2020). Поред тога, сматра се да употреба технике секвенцирања високе пропусности би открила још већи диверзитет у односу на тренутне процене. Међутим, тачна процена о врстама гљива захтева више истраживања о окружењу које инхибише гљиве, употребу нових молекуларних приступа, али пре свега кључна је сарадња и комуникација миколога широм света (Wu *u cap.*, 2019).

Од укупног броја описаних врста, око 10.000 припада лигниколним макрогљивама, док се више од 1.800 врста сматра медицински значајним, с обзиром на нутритивно и

функционално богатство примарних и секундарних метаболита и широк спектар биолошких активности попут антиоксидативних, антимикробних, имуномодулаторних, антиканцерогених и др. (Nagadesi и Stephen, 2022).

2.1.2. Таксономија гљива

У прошлости, гљиве су биле класификоване као део биљног царства, међутим, данашња сазнања о њиховим јединственим особинама у погледу начина живота, исхране и структуре ћелијског зида их издвајају у засебно царство још од класификације Whittaker-а 1969. године. Рана класификација је укључивала неколико група хетеротрофних еукариота које је карактерисала осмотрфна исхрана, укључујући и такозване „праве гљиве“ односно *Eumycota* које деле следеће особине: а) присуство β -гљукана и ћелијског зида хитина, б) једноћелијски организми или расту као мицелија – вишеједарна, цилиндрична ћелија са зидовима променљиве величине, в) присуство аминокиселинског пута за биосинтезу лизина и г) присуство спљоштених митохондријалних кристала (Whittaker, 1969; Adl *u cap.*, 2019). Међутим, заједно са биљкама и животињама, од којих су се, чини се, одвојиле пре отприлике милијарду година (на почетку неопротерозојске ере), оне деле одређене физичке, метаболичке и генетске особине (Табела бр. 1) (Deacon, 2005). Са друге стране, одређене особине су специфичне само за гљиве, попут могућности диморфних гљива да прелазе између фазе квасца и фазе хифа као одговор на услове околине, као и јединствене структуре ћелијског зида ове групе организама састављеног од комплекса хитина и гљукана (Alexopoulos *u cap.*, 1996). Штавише, данас су се границе истраживања ћелијског зида гљива значајно помериле, од дескриптивне фазе која дефинише основне гене и саставне делове зида, ка динамичнијим анализама начина на који се различите компоненте склапају, повезују и модификују као одговор на сигнале околине (Gow *u cap.*, 2017).

Табела 1. Упоредивање одређених особина гљива са особинама биљака и животиња (Deacon, 2005)

Особина	Гљиве	Животиње	Биљке
Раст	Раст помоћу хифа или пупљење код квасаца	Нема хифа	Вишећелијско ткиво
Исхрана	Хетеротрофи, упијају растворљиве хранљиве материје	Хетеротрофи, ингестија хране	Фотосинтеза
Ћелијски зид	Садржи хитин и глукан	Нема, али је хитин присутан у егзоскелету инсеката	Углавном од целулозе
Једро	Углавном хаплоидно, једарна мембрана опстаје током деобе	Углавном диплоидно, једарна мембрана се дезинтегрише током деобе	Диплоидно, једарна мембрана се дезинтегрише током деобе
Синтеза лизина	ААА пут	Нема синтезе	ДАР пут
Компоненте за складиштење енергије	Гликоген, липиди, трехалоза	Гликоген, липиди и код неких трехалоза	Скроб
Стероли мембране	Ергостерол	Холестерол	Биљни стероли

Данас, царство гљива обухвата широк спектар таксона који се разликују према екологији, животном циклусу и морфологији. Појава геномике и филогеномике је утицала на разрешавање таксономије ове групе организама, тако да ово царство обухвата једно подцарство, седам раздела, 10 подраздела, 35 класа, 12 подкласа и 129 редова (Hibbet *u cap.*, 2007). Међутим, главни раздели гљива се данас разликују највише на основу карактеристика репродуктивних структура, тако да класификација према Naranjo-Ortiz и Gabaldón (2019) обухвата укупно 9 клада на нивоу раздела:

1. *Opisthosporidia* – ова група представља монофилетску линију са заједничким еколошким и структурним карактеристикама, услед чега се сматра сестринском кладом гљива и обухвата три подгрупе (*Aphelidea*, *Rozellidea* и *Microsporidia*). Све познате врсте у овој клади су интрацелуларни паразити или паразитоиди широког спектра еукариота. Најпознатији родови ове групе су: *Aphelidium*, *Rozella*, *Nucleophaga*, *Nosema*, *Encephalitozoon*, *Amphiamblys* и *Metchnikovella* (Naranjo-Ortiz и Gabaldón, 2019).
2. *Chytridiomycota* – раздео је подељен у три главне класе: *Chytridiomycetes*, *Monoblepharidomycetes* и *Hyaloraphidiomycetes* (Sekimoto *u cap.*, 2011). Карактеристична је зооспорична фаза са покретним асексуалним спорама са флагелом (зооспоре), док је растућа фаза без бичева. Представници ове групе су важни патогени биљака попут врста рода *Synchytrium*, али и животиња (*Batrachochytrium*) (Naranjo-Ortiz и Gabaldón, 2019). Врсте рода *Chytridium* и *Dinomyces* су паразити алги, док неке врсте играју важну улогу и у воденим екосистемима с обзиром да контролишу алгалну биомасу и цветање (Kagami *u cap.*, 2014; Frenken *u cap.*, 2017). Са друге стране, неке врсте су разлагачи органских материја попут полена, целулозе, егзоскелета и др. (Naranjo-Ortiz и Gabaldón, 2019).
3. *Neocallimastigomycota* – мала група непаразитских гљива коју чини једна фамилија са укупно 18 родова. У питању су облигатни анаероби са флагелом (Nanafy *u cap.*, 2019).

4. *Blastocladiomycota* – група гљива код које је откривена смена гаметофитне и спорофитне генерације. Најпознатије и најистраженије врсте су *Allomyces macrogynus* и *Blastocladiella emersonii* (Naranjo-Ortiz и Gabaldón, 2019).
5. *Zoopagomycota* – ова група гљива је прва дивергирала од флагеларних гљива. Укључује три главне линије које имају способност формирања праве мицелије (*Zoopagomycotina*, *Entomophthoromycotina* и *Kickxellomycotina*) (Hibbet *u cap.*, 2007).
6. *Mucoromycota* – најбројнији и најбоље проучен раздео зигомицетних гљива (*Zygomycota*) које расту као сапроби. Укључује два подраздела, *Mortierellomycotina* и *Mucoromycotina*. Одређене врсте овог раздела су важне за индустрију хране са аспекта кварења хране, док врсте редова *Mucorales* (*Mucoromycotina*) и *Mortierellales* (*Mortierellomycotina*) се користе у производњи хитозана, липида и каротеноида (Papanikolaou *u cap.*, 2007; Londoño-Hernández *u cap.*, 2017; Naranjo-Ortiz и Gabaldón, 2019).
7. *Glomeromycota* – сви чланови овог раздела живе као облигатни симбионти копнених биљака, формирајући арбускуларне микоризе. Чланови овог раздела су одвојене од осталих *Zygomycota* на основу филогеније рибозомалних протеина (Schüßler *u cap.*, 2001). Поред тога, врсте овог раздела немају ергостерол, а главни мембрански стерол је 24-етил-холестерол (Weete *u cap.*, 2010).
8. *Basidiomycota* – друга најбројнија група гљива коју карактеришу базидије. Поред тога, ова група представља најсложеније гљиве у погледу животног циклуса (нпр. код врсте рода *Puccinia* која има неколико домаћина и слободноживећих форми) и формирања плодних тела (нпр. код врсте рода *Armillaria*) (Hibbett *u cap.*, 2007; McLaughlin и Spatafora, 2015).
9. *Ascomycota* – око две трећине свих описаних врста припада овом разделу (McLaughlin и Spatafora, 2015), док велики број врста представља модел организме у многим генетским истраживањима (*Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Emericella nidulans*, *Schizosaccharomyces pombe* и др.) (Naranjo-Ortiz и Gabaldón, 2019). Репродукција подразумева формирање краткоживеће дикарионске хифе која доводи до образовања аскуса, врећасте

структуре која садржи (обично осам) аскоспоре. Раздео је подељен у три главне класе: *Taphrinomycotina*, *Saccharomycotina* и *Pezizomycotina* (Stajich *u cap.*, 2009; Spatafora *u cap.*, 2017).

Са друге стране, дилема око прихватања постојања неких раздела постоји и данас, с обзиром да неки аутори подразумевају постојање 13 раздела, и то: *Aphelidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Calcarisporiellomycota*, *Chytridiomycota*, *Entomophthoromycota*, *Entorrhizomycota*, *Glomeromycota*, *Kickxellomycota*, *Olpidiomycota*, *Rozzelomycota*, *Zoopagomycota*, *Basidiomycota* и *Ascomycota* (He *u cap.*, 2019).

2.1.3. Употреба гљива

Употреба гљива има дубоке корене у прошлости људске цивилизације, с обзиром да су се користиле као извор хране (тартуфи и печурке), док су се квасци користили у пекарству, као и у процесима ферментације у производњи пива, вина и соса од соје (Barzee *u cap.*, 2021).

Мицелија одређених врста гљива садржи витамине, дијетска влакна (β -гљукани и хитин), есенцијалне аминокиселине и здраве липиде, а балансирана употреба ових компоненти је повезана са многим здравственим бенефитима, укључујући смањен ниво холестерола, побољшање имуног одговора, али и превенцију и ублажавање симптома кардиоваскуларних болести, гојазности и дијабетеса (Barzee *u cap.*, 2021). Штавише, печурке су једини природни, необогаћени јестиви извор витамина D и садрже корисне минерале попут селена, калијума, гвожђа, бакра и фосфора, али и холина који помаже у побољшању сна, покрета мишића, памћења и учења (Kumari, 2020; Takahashi *u cap.*, 2020). Стога се јестиве гљиве конзумирају и гаје широм света као важна компонента здраве људске исхране.

Конзумација гљива као хране углавном подразумева конзумацију печурака из раздела *Basidiomycota* и *Ascomycota*, у којима се ужива широм света и које могу бити комерцијално узгајане или дивље. *Agaricus bisporus* је често конзумирана врста на Западу, која се користи у салатама, супама и многим другим јелима, заједно са другим азијским врстама, попут шитаке (*Lentinula edodes*), енокитаке (*Flammulina spp.*), вргања (*Boletus edulis*) и др.

(Takahashi *u cap.*, 2020). Коришћење гљива у индустрији хране је засновано на способности гљива да разлажу биомасу и формирају јединствене укусе, боје и текстуре. На пример, гљиве се користе преко 3.000 година у производњи *koji* и соја соса захваљујући способности секреције ензима и разлагању сојиног зрна, док се преко једног века врста *A. niger* комерцијално узгаја у потопљеној култури и употребљава за продукцију лимунске киселине (Paragianni, 2007). Гљиве које расту као квасци (*Saccharomyces cerevisiae* и *S. pastorianus*) представљају добро познати традиционални „алат“ за производњу пива, вина и дестилованих жестоких пића, као и хлеба и пецива (Barzee *u cap.*, 2021). Врста *Fusarium venenatum* се користи за производњу микопротеинског производа познатог као *Quorn™* помоћу ферментора који ради у континуираном аеробном режиму (Wiebe, 2004). Поред тога, одређене врсте сирева захтевају инокулацију плесни (*Penicillium roqueforti*) у циљу постизања посебног укуса и текстуре, док се врсте рода *Rhizopus* користе за прављење темпеха, традиционалног индонезијског прехранбеног производа (Hachmeister и Fung, 1996; Abei *cap.*, 2006). Међутим, улога гљива у здрављу људи и животиња сеже много дубље од признатих здравствених користи печурака и значајно превазилази њихов статус деликатесних и гурманских производа (Takahashi *u cap.*, 2020).

Са друге стране, разноврсне филаментозне гљиве се већ више од једног века користе као високо продуктивни организми за производњу бројних производа који се примењују у медицини (имуностимуланси и суплементи хране), фармакологији (антибиотици, антифунгициди, антивирусни агенси, антиканцерогени агенси, антидијабетогени агенси итд.), козметичкој индустрији, али и пољопривреди (средства за биоконтролу гљива, инсеката, корова, извор хране и протеина, побољшање стања усева, итд.) (Cartabia *u cap.*, 2022; Karaman *u cap.*, 2022). Значај филаментозних гљива се огледа у њиховој способности да одговоре на различите захтеве за развој функционалне хране, нутрацеутика и биоактивних супстанци које се могу користити у виду биомасе или метаболита које производе (Takahashi *u cap.*, 2020). Међутим, у већини случајева су главни производи једињења која гљиве излучују или трансформишу, која се добијају узгајањем гљива на јасно дефинисаним супстратима са доступним извором угљеника и хранљивих материја (Barzee *u cap.*, 2021). Производи многих врста су комерцијално доступни, укључујући и примере

микроскопских филаментозних гљива које се лако култивишу у *ex situ* условима, попут врста родова *Penicillium*, *Aspergillus* и *Fusarium*, али и мање познате врсте попут *Ashbya gossypii* која образује витамин B2 (Takahashi *u cap.*, 2020).

Широк спектар природних боја се добија из метаболита гљива различитих родова укључујући *Eurotium*, *Fusarium*, *Monascus*, и *Penicillium*, што омогућава сигурнију и здравију исхрану и представља алтернативу синтетичким колорантима (Kalra *u cap.*, 2020). Поред тога, производња колораната на бази гљива је економски исплативија, с обзиром да скалирање зависи од манипулације параметара ферментације, а не сезонских фактора као што је то случај код пигмената и боја биљног порекла (Takahashi *u cap.*, 2020).

Флемингово откриће првог антибиотика из врсте *Penicillium notatum*, 1929. године је отворило златну еру нове терапије и променило квалитет људских живота. Ово је иницирало нова истраживања и експлоатацију многих микроорганизама као извора антибиотика, и довело до развоја биотехнолошких процеса (Silber *u cap.*, 2016). Педесетих година прошлог века, цефалоспорин С и природни бета лактамски антибиотици су изоловани из врсте рода *Cephalosporium* (данас *Acremonium*) сакупљене на обали Сардиније (Abraham *u cap.*, 1953; Newton и Abraham, 1955), а касних седамдесетих година откривен је глиотоксин, нови тип антибиотика дикетопиперазина, кога продукује *Aspergillus sp.* (Okutani, 1977). Поред антибиотика, гљиве синтетишу и антифунгалне агенсе, попут грисеофулвина изолованог из врсте *Penicillium griseofulvum* (Loo, 2006), али и статине (мевастатин из *Penicillium citrinum* и ловастатин из *Aspergillus terreus*), класу секундарних метаболита која је постала мета многих истраживања захваљујући утицају на *de novo* синтезу ендогеног холестерола (Manzoni *u cap.*, 1999; Manzoni и Rollini, 2002). Секундарни метаболити из гљива имају широку терапеутску примену, попут мевинолина, потентног агенса који снижава холестерол, изолованог из врсте *Aspergillus terreus*, али и асперцилина из *Aspergillus alliaceus* из кога су касније изведени бензодиазепини који се користе за лечење анксиозности и инсомније (Gurnani *u cap.*, 2014). Поред тога, утврђено је да норсолоринска киселина изолована из *Aspergillus spp.* проузрокује апоптозу ћелија канцера дојки (MCF-7) и ћелија људског канцера јетре (Т-24) (Bladt *u cap.*, 2013). Међутим, многи примарни метаболити изоловани из гљива су такође нашли примену у клиничкој пракси, попут полисахарида

лентинана изолованог из шитакеа, који је клинички признат лек у терапији канцера у Јапану (Sullivan *u cap.*, 2006). Додатно, крестин (полисахарид К), добијен из врсте *Trametes versicolor*, представља клинички одобрено помоћно средство у терапији канцера (Fritz *u cap.*, 2015).

Данас је на тржишту доступан читав низ нових производа базираних на гљивама, док су одређени производи још у процесу истраживања и комерцијализације. Наиме прехранбени производи засновани на гљивама прешли су од узгоја печурака у производњу прерађене хране попут алтернативних протеина који опонашају месо стоке, затим кафе и чајева, немлечних сирева и млека (Meuer *u cap.*, 2020). Поред производа на бази хране, гљиве се такође примењују у производима за здравље и лепоту, као текстил, као биоразградива амбалажа, као храна за кућне љубимце, али и за санацију животне средине и пољопривреду (Barzee *u cap.*, 2021). Управо зато биотехнологија заснована на филаментозним гљивама неопходна је за наш свакодневни живот, а скоро век након њеног настанка, она тренутно доживљава процват нудећи одржива решења у разним индустријама (Meuer *u cap.*, 2020).

2.1.4. Екологија гљива

Гљиве представљају једну од најраспрострањенијих група организама на планети Земљи (Boddy и Niscox, 2016; Сороџ и Тănăse, 2019). Оне играју и једну од главних улога у функционисању шумских екосистема, с обзиром да врсте које имају узајамни однос са дрвећем односно ектомикоризне гљиве, као и лишајеви (однос са алгама) значајно доприносе примарној производњи шума (Bässler *u cap.*, 2016). Са друге стране, лигниколне гљиве представљају групу гљива која је најефикаснија у разлагању органске материје и одговорне су за пропадање дрвета и реинтеграцију органске материје шумских екосистема (Сороџ и Тănăse, 2019). Ова често неупадљива група представља важну карику у процесу кружења нутријената, са посебним нагласком на сапротрофне и симбиотске врсте које разлажу органску материју до неорганских молекула, чинећи их доступним биљкама и другим организмима (Varea *u cap.*, 2005). Наиме, мртво дрво представља једнак или већи

извор угљеника у поређену са живим дрвећем, што додатно доприноси огромном значају сапротрофних и сапропаразитских врста лигниколних гљива (Сороџ и Тănase, 2019).

Гљиве разлагачи, по својој природи, непрестано исцрпљују органске ресурсе у којима расту и хране се и стога се ослањају на континуирано успешно ширење ка новим ресурсима. У циљу превазилажења ових потешкоћа и искориштавања доступних ниша, многе врсте су развиле различите различите животне стратегије, а неке често могу комбиновати особине различитих стратегија или варирати у својој стратегији током различитих фаза животног циклуса (Boddy и Hiscox, 2016). На пример, рудералне врсте користе компоненте мале молекулске тежине за брз развој, док врсте толерантне на стрес се суочавају са екстремним окружењем, попут ниске влажности или високих температуре, а неке секретују инхибиторне компоненте или поседују прерастајуће мицелије (Petre *u cap.*, 2014). Међутим, способност сапротрофа да развију мрежасту мицелију која ће искористити празан простор унутар супстрата у потрази за водом и органским компонентама представља далеко најбоље развијену стратегију (Сороџ и Тănase, 2019). Многе лигниколне врсте користе агрегатне структуре хифа (ризоморфе) за транспорт воде и нутријената кроз мицелију, што им заједно са способношћу разлагања омогућава колонизацију већине екосистема (Сороџ и Тănase, 2019). Супротно томе, ензими ових врста не могу да се транспортују на велике удаљености, што условљава ширење система хифа унутар новог дрвета, односно супстрата (Petre *u cap.*, 2014).

Велики број студија је утврдио да су варијабле које карактеришу шумску састојину (нпр. старост, количина мртвог дрвета, континуитет станишта, микроклима) важни покретачи разноликости сапротрофних врста (Junninen *u cap.*, 2006; Bässler *u cap.*, 2010; Bässler *u cap.*, 2016), док су процеси освајања, ширења и конкурентска способност кључни за њихову успешну колонизацију (Boddy и Hiscox, 2016).

2.2. Лигниколне гљиве

Лигниколне гљиве представљају посебну групу гљива које као супстрат користе дрво, у оквиру које се разликују сапротрофи и паразити, у зависности да ли експлоатишу мртву или живу дрвну масу. Гљиве које припадају групи лигниколних гљива претежно су одговорне за разлагање лигноцелулозног материјала захваљујући производњи специфичних ензима, нарочито из раздела Basidiomycota (Karaman и Matavulj, 2005; Сороџ и Тănase, 2019). Са друге стране, значај ове групе гљива се огледа у функционисању шумских екосистема, с обзиром да лигниколне врсте представљају кључне актере за реинтеграцију угљеника и чувају виталност шума (Сороџ и Тănase, 2019).

Лигнин представља биополимер високе молекулске тежине, хемијски формиран од фенол-пропаноидних јединица повезаних ковалентним везама, док га садржај огромне количине угљеника чини критичним у глобалном циклусу угљеника (Paliwal *u cap.*, 2019). У циљу разградње тешко растворљивог лигнина, лигниколне гљиве се у условима богатим кисеоником ослањају на свој ензимски комплекс, који садржи целулазе и лигнинолитичке ензиме, изазивајући тако микробну лигнинолизу (Petre *u cap.*, 2014). Управо на основу начина на који ове врсте разлажу дрво, ова изузетно морфолошки и еколошки разноврсна група гљива се може поделити на три подгрупе, у зависности од типа разградње које проузрокују:

- 1) гљиве меке трулежи,
- 2) гљиве мрке трулежи и
- 3) гљиве беле трулежи.

Меке трулежнице разлажу полисахариде на површинским слојевима биљака и обухватају углавном врсте родова *Aspergillus* и *Neurospora*, као и друге врсте из раздела Ascomycota (Andlar *u cap.*, 2018). Ове врсте показују ограничене способности разградње лигнина формирајући ланац шупљина унутар секундарних ћелијских зидова (Paliwal *u cap.*, 2019), а деградација целулозе је узрокована производњом ензима целулаза (Karaman *u cap.*, 2012; Сороџ и Тănase, 2019). Преферирају влажан супстрат, делимично распаднут (са мање

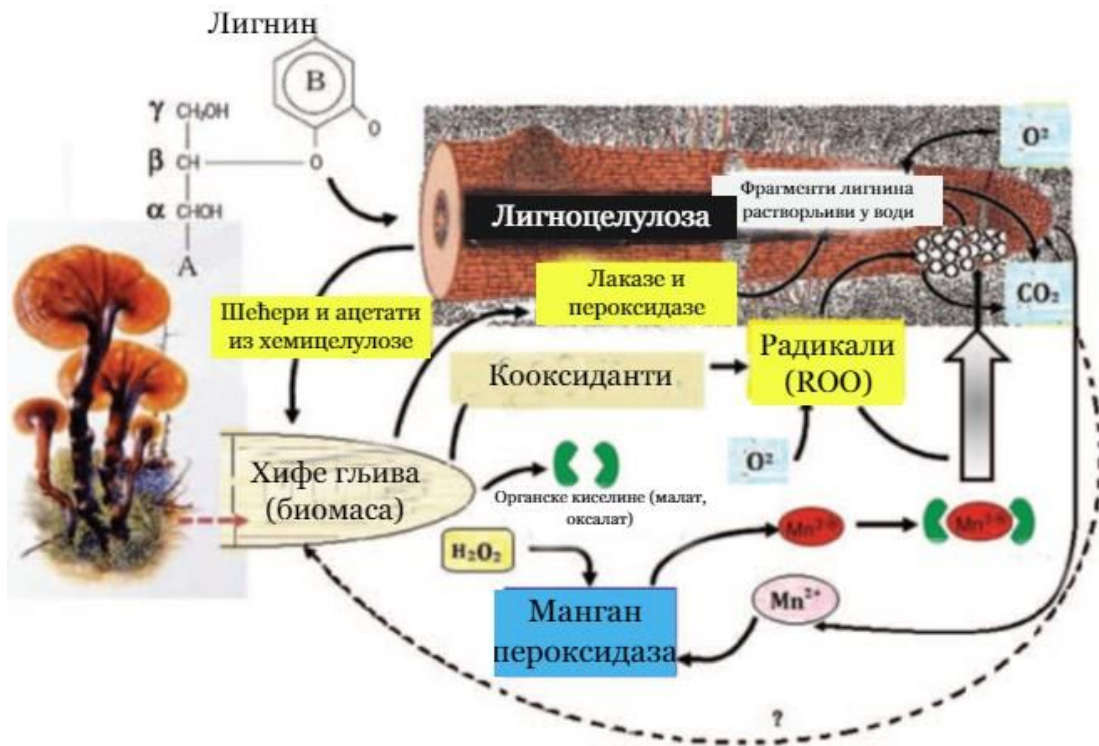
лигнина) и имају способност да разлажу дрво под неповољним условима за базидиомицете, попут суше, високе влажности и скоро потпуног zasiћења водом (Coroṭ и Tānase, 2019). Дубоко пенетрирајућа мека трулеж настаје када је у дрвету присутан висок садржај влаге, али није засићено, а сушењем меког иструнулог дрвета долази до развитка површинских шавова како се дрво скупља и дрво добија браон боју, што је слично пропадању изазваног мрким трулежницама. Међутим, у поодмаклој фази пропадања дрво ће се распасти или постати ломљиво када се подигне површински комад као код врсте *Kretzschmaria deusta* (Sista Kameshwar и Qin, 2018).

Мрке трулежнице након разградње хемицелулозе и целулозе, остављају лигнин за собом, а као последица накупљања овог полимера остаје остатак браон боје (Кijропnyongran и сар., 2022). Хифе ових врста продиру у лумен ћелије, и колонизују ћелије зрака и аксијалне паренхимске ћелије како би приступиле угљеним хидратима који представљају битне изворе енергије (Arantes и Goodell, 2014). Мрке трулежнице су главни нападачи шумске биомасе и конструкција на бази дрвета, а сматра се да су еволуирале од сапротрофних гљива беле трулежи губитком неколико есенцијалних гена који кодирају ензиме који разграђују лигноцелулозу (Sista Kameshwar и Qin, 2018). Упркос губитку ензимских система, гљиве смеђе трулежи су и даље способне да деполимеризују хемицелулозу и у великој мери модификују лигнин (Andlar и сар., 2018). Модификација лигнина подразумева оксидативну деметилацију, оксидацију бочног ланца, деполимеризацију и потенцијалну реполимеризацију, али упркос свим овим променама, лигнин и даље остаје полимеран, што може објаснити зашто су раније студије закључиле да гљиве мрке трулежи само незнатно модификују лигнин (Arantes и Goodell, 2014). Врсте ове групе (*Serpula lacrymans*, *Fibroporia vaillantii*, *Coniophora puteana*, *Phaeolus schweinitzii*, *Fomitopsis pinicola* и др.) налазе се првенствено на четинарским шумама и играју играју важну еколошку улогу у бореалним шумама, услед чега већина гљива смеђе трулежи има бореалну дистрибуцију (Coroṭ и Tānase, 2019).

2.2.1. Гљиве беле трулежи

Гљиве беле трулежи имају значајну улогу у процесу биолошке делигнификације, с обзиром да поседују снажан систем ензима за разградњу лигнина, најнапреднијег природног ароматичног полимера који се тешко разграђује (Ćilerdžić *u cap.*, 2017; Paliwal *u cap.*, 2019). Ове врсте доминирају у првим стадијумима разградње, с обзиром да разлажу лигнин, целулозу и хемицелулозу (Сороџ и Тапаса, 2019). Штавише, ова подгрупа гљива је једина способна да комплетно разложи све компоненте лигнина до угљен-диоксида и воде (Кижорњуонгпан *u cap.*, 2022), док као последица њихове активности долази до промене текстуре дрвета, која постаје влажна, сунђераста и светлија услед потпуног разлагања лигнина и других угљенохидратних компоненти дрвета (Karaman *u cap.*, 2012; Novaković, 2017).

Ензимски систем који учествује у разградњи лигнина укључује комплекс различитих ензима попут лигнин пероксидазе, манган зависне пероксидазе, лаказе, оксидазе која продукује водоник пероксид, глиоксилних оксидаза и арил-алкохолних оксидаза (Andlar *u cap.*, 2018). Међутим, показано је да различите врсте белих трулежница, као и различити сојеви истих врста са различитих локалитета, могу да садрже различит кључни ензимски систем за разградњу овог полимера (Zhou *u cap.*, 2013). Процес разградње је подстакнут синергизмом екстрацелуларних ензима и реактивних кисеоничних врста, а јавља се у фази секундарног метаболизма када су главни хранљиви састојци, попут азота, угљеника и сумпора, ограничени (Ander *u cap.*, 1980; Zhou *u cap.*, 2013). Ова ланчана реакције заснована је на коришћењу слободних радикала, када водоник пероксид активира каталазу и покреће формирање високо активних слободних радикала интермедијера, а затим катализује оксидацију супстрата различитим слободним радикалима насталим ланчаним реакцијама (Zhou *u cap.*, 2013) (Слика 1). За успешан ток овог процеса неопходно је присуство кисеоника, а као нуспроизвод се ослобађа ванилинска киселина (Ander *u cap.*, 1980; Кижорњуонгпан *u cap.*, 2022). На овај начин, гљива добија угљеник из шећера, док је недавно утврђено да може да усвоји угљеник и из ароматичних једињења добијених од лигнина (del Cerro *u cap.*, 2021), што узрокује обогаћивање целулозом и ствара бели остатак распадања (Кижорњуонгпан *u cap.*, 2022).



Слика 1. Шематски приказ разградње лигнина од стране гљива беле трулежи које припадају разделу Basidiomycota (адаптирано из Zhou *и сар.*, 2013)

До данас је описано на хиљаде врста које припадају белим трулежницима, али само десетак врста је у стању да разгради лигноцелулозу, попут врста родова *Trametes*, *Bjerkandera*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Lentinula* и др (Zhou *и сар.*, 2013). Ове врсте су способне да потпуно разграде дрво, али се разликују по степену пропадања целулозе, с обзиром да неке врсте једва разлажу целулозу (*Bjerkandera adusta*), неке разграђују лигнин и хемицелулозу (*Heterobasidion annosum*), док агресивни сапропаразити истовремено разлажу све три компоненте (*Fomes fomentarius*, *Phellinus igniarius*) (Сороџ и Тăнăсе, 2019).

Захваљујући широком спектру супстрата и присуству еколошки прихватљивих деградативних ензима, гљиве беле трулежи и њихови екстрацелуларни ензими су постали предмет примењених биотехнолошких истраживања. Беле трулежнице имају потенцијал да постану извори активних лигноцелулозних ензима, заједно са комерцијално доступним

коктелима ензима хемицелулаза и целулаза пореклом из *Ascomycota*, попут врста *Aspergillus niger* и *Trichoderma reesei* (Andlar *u cap.*, 2018). На пример, позната је њихова примена у разградњи и ремедијацији органских загађивача, попут фармацеутских активних једињења, полицикличних ароматичних угљоводоника, тешких метала, хербицида, пестицида и др. (Chen *u cap.*, 2022).

Када је у питању врста *S. commune* Fr., познато је да она као супстрат користи најмање 150 родова дрвенстих биљака, али и да колонизује силажу меког дрвета и траве (Ohm *u cap.*, 2010). Управо колонизација разноликих лигноцелулозних супстрата је чини занимљивом у биотехнолошком смислу јер проширује спектар биотехнолошких производа, попут ензима, биосурфактаната, биоетанола, полисахарида, полимера и др., који се могу добити из ове гљиве (Tovar-Herrera *u cap.*, 2018). Последишно, у последњих 15 година дошло је до значајног повећања биотехнолошког значаја ове врсте, док је везано за геном, ензимске комплексе и биолошку разноврсност врсте *S. commune* Fr., у периоду од 1995. до 2017. године, регистровано више од 6.000 докумената за пријаву патената и технолошких извештаја широм света (Табела 2) (Tovar-Herrera *u cap.*, 2018).

Табела 2. Одобрени и примењени патенти врсте *S. commune* Fr.

Техничке и индустријске области патената (пријављени или одобрени)	Апликант(и) и година	Референца
<i>Селективна и оријентисана производња и припрема ензима</i>		
Припрема глукоамилазе	TAX ADM Agency (Јапан, 1984)	Shimazaki и Sato, 1984
Производња билирубин-оксидазе	Takara Shuzo Co. Ltd (Јапан, 1986; 1984)	Matsui <i>u cap.</i> , 1986; Susumu <i>u cap.</i> , 1984
Производња холестерол оксидазе и њена употреба у модификацији природних спиростана	Toejepast Natuur Onderzoek, (Холандија, 1988); Ono Pharmaceutical Co., Ltd. (Осака, Јапан, 1977)	Kerkenar Anthonius inventor, NO voor TNO (1988) и Sugiura <i>u cap.</i> , 1977
Производња ксилогликан ендотрансгликозилаза	Novozymes A/S (Европа, 2000)	Plum, 2000
Производња холестерол естеразе	Toyobo Co. Ltd. (Јапан, 1978)	Aisui <i>u cap.</i> , 1976
Производња пантолактон хидролазе	Fuji Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisha (Јапан, 1996)	Sakamoto <i>u cap.</i> , 1996
Производња ксиланазе и лаказа за третман разлагања дрвне пулпе и лигнина	Mercian Corp. Japan Bioindustry Association Agency of Ind. Science & Technol (Јапан, 2000); Clariant Finance (bvi) Limited Sandoz (Европа, 1997)	Behrendt <i>u cap.</i> , 1997; Hitoshi <i>u cap.</i> , 2000
Производња термостабилних ксиланаза	National Research Council of Canada (Канада, 2001)	Wing, 2001
Производња термо-резистентне трехалоза фосфорилазе	Kureha Chem. Ind. Co. Ltd (Јапан, 2004)	Eisaki <i>u cap.</i> , 2004
Мултифункционалне целулазе	Dyadic International (САД, 2013) Ltd. (САД); Novozymes A/S (2014).	Emalfarb <i>u cap.</i> , 2013; Kuilderd <i>u cap.</i> , 2014

Ензимски комплекс са активношћу естеразе хлорогене киселине и активношћу ферулоил естеразе	Stern Enzym GmbH & Co. KG (Данска, 2014)	Nieter <i>u cap.</i> , 2016
--	--	-----------------------------

Добијање и припрема секундарних метаболита и деривата са великом додатном вредношћу

Припрема и употреба β -глюкана	Birch Stewart Kolasch & Birch (САД, 2009)	Kim <i>u cap.</i> , 2009
Припрема неошизофилана	Taito Co., Ltd. (Токио, Јапан, 1978) & Kaken Chemical Co., Ltd. (Токио, Јапан, 1978)	Kikumoto <i>u cap.</i> , 1978
Припрема трехалозе	Kureha Chem. Ind. Co. Ltd (Јапан, 1994)	Takashi и Eisaku, 1994
Припрема шизостатина	Sankyo Co. Ltd (Јапан, 1995)	Yoshio <i>u cap.</i> , 1995
Припрема стахиозе	Infinitus (Кина, 2017)	Meng <i>u cap.</i> , 2017
Добијање ерготионеина	Mitsubishi Shoji Foodtech Co Ltd (Јапан, 2015)	Tokumits, 2015
Припрема шизофилана	Ningbo Xinuoya Marine Biotechnology Co. Ltd (Кина, 2016)	Hui, 2016
Производња хуперзина А	Univ. Fujian Traditional Chinese Medicine (Кина, 2014)	Yaxuan, 2014

Процеси и прототипови

Козметичке креме за локалну употребу	MAX FUAKUTAA КК (Јапан)	Fukada <i>u cap.</i> , 1993
Процес оксидативног бојења кератина влакана	Casalonga Axel Bureau (Европа, 2002)	Gregory, 2002
Третман ендоглуканазом лигноцелулозних материјала и селективна деградација смолних киселина и тритерпена	Novozymes, A/S (САД, 2002)	Schülein <i>u cap.</i> , 2002

Производња биогорива 2. генерације из биљне биомасе путем целулолитичких ензима	IFP (France, 2009)	Margeot Antoine, 2009
Процес разградње деривата лигнина и диоксина у теренским условима	Idemitsu Kosan Co. Ltd (Јапан, 2001)	Yuki Junishiro, 2001
Процес деградације егзогених ендокриних дисруптора	Idemitsu Kosan Co. Ltd. (Јапан, 2002)	Genshi и Takahiro, 2002
Процес разградње приона	Kondo Ryuichiro (Јапан, 2005)	Ryuichiro <i>u cap.</i> , 2005
Процес за производњу алкохола или растварача друге генерације	IFP Énergies Nouvelles (Француска, 2012)	Ropars <i>u cap.</i> , 2012
Дизајн имунолошких канцер терапија	Therapy Co. Ltd (Јапан, 2000)	Akiyuni и Takashi, 2000
Процес селективног уклањања хексенуронских група из биомасе	Siika-aho, Matti (САД, 2004)	Siika-Aho <i>u cap.</i> , 2004
Формулације екстракта мицелија за потенцирање отпорности пчелињих колонија на синдром гљивично-вирусног колапса	Paul Stamets and Co. (САД, 2015, 2017)	Stamets, 2015; 2017
Метода биолошке сахарификације коришћењем биомасе	PHYGEN Inc (Кореја, 2016)	Kul <i>u cap.</i> , 2017
<i>Додаци исхрани</i>		
Повећање имунитета код јастога	Dingyuan County Profess. Coop. (Кина, 2016)	Guanghong, 2016
Крма за краве млекаре	Xuzhou Jiwang Xintuo Animal Husbandry Co. Ltd. (Кина, 2016)	Xiume, 2016

Компаративна геномика је значајно обогатила разумевање еволуције фамилије ензима који разграђују ћелијске зидове биљака, али је разумевање ензимског дијапазона код класе *Agaricomycetes* још увек непотпуно. Штавише, неколико врста је изазвало недоумице у вези са поделом на гљиве беле трулежи и мрке трулежи, што је подстакло поновно разматрање ове класичне дихотомије (Almasi *u cap.*, 2019). На пример, врста гљиве *S. commune* Fr., једина секвенционирана врста у оквиру фамилије *Schizophyllaceae*, показује симптоме сличне белим трулежницама, али не поседује пероксидазе, карактеристичну генску фамилију ензима белих трулежница који разграђују лигнин услед високог оксидационог потенцијала (Almasi *u cap.*, 2019). Штавише, геному *S. commune* Fr. недостаје класа II пероксидаза у коју спадају лигнин пероксидаза и манган пероксидаза, док је комплекс целобиохидролаза (фамилија гликозидних хидролаза) који носе домене за везивање целулозе редукован (Riley *u cap.*, 2014). Ове особине генома су карактеристичне за мрке трулежнице, с обзиром да геноми ових врста не кодирају ову класу пероксидаза, док су гени који кодирају целобиохидролазу генерално одсутни или им недостаје домен за везивање целулозе (Riley *u cap.*, 2014; Almasi *u cap.*, 2019). Са друге стране, геном врсте *S. commune* Fr. поседује 22 гена који кодирају литичке полисахаридне монооксигеназе, ензиме карактеристичне за беле трулежнице, док је ПСА анализа показала да ова врста узрокује другачији начин пропадања у односу на мрке трулежнице *Botryobasidium botryosum* и *Jaapia argillacea*, са којима дели одсуство пероксидаза (Riley *u cap.*, 2014). Међутим, анализа напретка деградације дрвета, открила је да се понашање ове врсте додатно поклапа и са белим и са мрким трулежницама, што је отворило многа питања у вези са биологијом ове врсте (Zhu *u cap.*, 2016).

2.3. Phylum Basidiomycota

Раздео (Phylum) Basidiomycota заузима друго место по бројности врста након раздела Ascomycota, са преко 30.000 описаних врста (He *u cap.*, 2019). Представници овог раздела припадају углавном филаментозним гљивама које су изграђене од хифа. Базидиомицетне хифе су септама подељене на мононуклеарне, бинуклеарне или мултинуклеарне сегменте (Raghukumar и Raghukumar, 2017). Ћелијски зид се састоји од хитина, чије су фибриле урођене у матрикс формиран од $(1\rightarrow3)$ - β ($1\rightarrow6$) β -гљукана, али и манана код ћелија квасаца (He *u cap.*, 2019).

Репродукција се одвија путем сексуалних или асексуалних спора. Сексуална репродукција је резултат кариогамije у бинуклеарним ћелијама и доводи до формирања четири мејотичке образоване базидиоспоре егзогеног типа на базидији које настају у базидиокарпу односно плодном телу (Raghukumar и Raghukumar, 2017; He *u cap.*, 2019). Као и код свих дикарија (Dikarya), митоза код базидиомицета се одвија уз очување нуклеарне мембране (интрануклеарна плеуромитоза), док само код неких Urediniomycetes нуклеарна мембрана делимично деградира током митозе (полуотворена плеуромитоза) (Zmitrovich и Wasser, 2011). Подраздео *Agaricomycotina* продукује макроскопске структуре за полну репродукцију (базидиокарп), које су типичне печурке, вргањи, земаљске звезде, лоптасте структуре (пухаре), и др. (Raghukumar и Raghukumar, 2017). Са друге стране, неки таксони не формирају базидиокарп, али се сврставају у раздео *Basidiomycota*, као што су рђе које припадају подразделима *Pucciniomycotina* и *Ustilaginomycotina*. Овом разделу припадају и таксони који формирају групу квасаца, који се обично налазе у асексуалној фази живота (He *u cap.*, 2019).

Према најновијој верзији Речника гљива аутора Ainsworth-а и Bisby-ија (2008), постоји 1.589 родова унутар раздела *Basidiomycota* (Kirk *u cap.*, 2008). Међутим, нове генетичке студије су омогућиле увођење нових таксона, што је умногоме обогатило познату расноврсност овог раздела. У вези са тим, у филогенетским студијама базидиомицетних квасаца уврштене су три нове класе, три нова реда, 16 нових фамилија и 47 нових родова, док је код подраздела *Agaricomycotina* додато преко 100 нових родова (He *u cap.*, 2019).

Класа (Class) Agaricomycetes садржи паразитске, патогене, симбитоске и сапротрофне врсте, док сви чланови ове класе формирају печурке и широко су распрострањени на копну, али и у неким воденим екосистемима (Webster и Weber, 2007). Класа садржи 22 реда, укључујући и ред (Order) Agaricales, који садржи углавном сапротрофе, али и неке паразитске и микоризне врсте, док се базидија формира у слојевима (хименија) на доњој страни меснатих плодних тела, у цевима (вргањи) или ламелама (печурке) (Hibbett *u cap.*, 2014). Представници овог реда су врсте родова *Agaricus*, *Armillaria*, *Coprinus*, *Schizophyllum*, *Pleurotus* и др.

2.4. Род (Genus) *Schizophyllum*

У оквиру фамилије *Schizophyllaceae*, коју одликују пехараста или округла плодна тела причвршћена за супстрат леђном или бочном страном разликујемо два рода *Auriculariopsis* и *Schizophyllum* и седам врста (Kirk *u cap.*, 2008; Ranković, 2011). Назив рода *Schizophyllum* потиче од латинских речи „*schizo*“ што значи расцеп, описујући јединствене карактеристике и морфологију овог рода, односно ламеларне хименофоре са радијално ексцентричним ламелама које су уздужно подељене на ивицама (Mahajan, 2022).

На макроскопском нивоу, врсте рода *Schizophyllum* су врло тврде, шкољкастог или лепезастог облика, прекриврене густим и замршеним длакама, режњеви су назубљених ивица, са сивкасто-беличастом површином и сувом и кожастом конзистенцијом. На микроскопском нивоу, површина шешира (*лат. pileus*) има слој ресица, познат као „пеликула“, који се састоји од испреплетаних хифа, које варирају у дужини и густини узависности од врсте. Споре су углавном елиптичне или цилиндричне (Carreno-Ruiz *u cap.*, 2019, Mišković *u cap.*, 2023).

Током дугог временског периода, таксономија овог рода била је упитна и значајно се мењала због уочавања различитих морфолошких особина. Наиме, Fries је описао овај род 1815 и уврстио у фамилију *Agaricaceae*, док је касније уврштен у оквиру реда *Polyporales* и фамилије *Tricholomataceae* и *Thelephoraceae* (Cooke, 1961; Carreno-Ruiz *u cap.*, 2019). Данас род *Schizophyllum* припада фамилији *Schizophyllaceae*, и реду *Agaricales*.

У оквиру овог рода, описано је до сада 15 врста према бази Index Fungorum-a (<https://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>) укључујући

- *S. album* Rick,
- *S. amplum* (Lev.) Nakasone,
- *S. commune* Fr.,
- *S. brasiliense* W.B. Cooke,
- *S. brevilamellatum* Linder,
- *S. fasciatum* Pat.,
- *S. leprieurii* Linder,
- *S. murrayi* Masee,
- *S. palmatum* Jungh. ex W.B. Cooke,
- *S. umbrinum* Berk.,
- *S. radiatum* Fr.,
- *S. variabile* Sorokin,
- *S. lobatum* Went,
- *S. mexicanum* Pat, и
- *S. miia* (Scop.) Fr.,

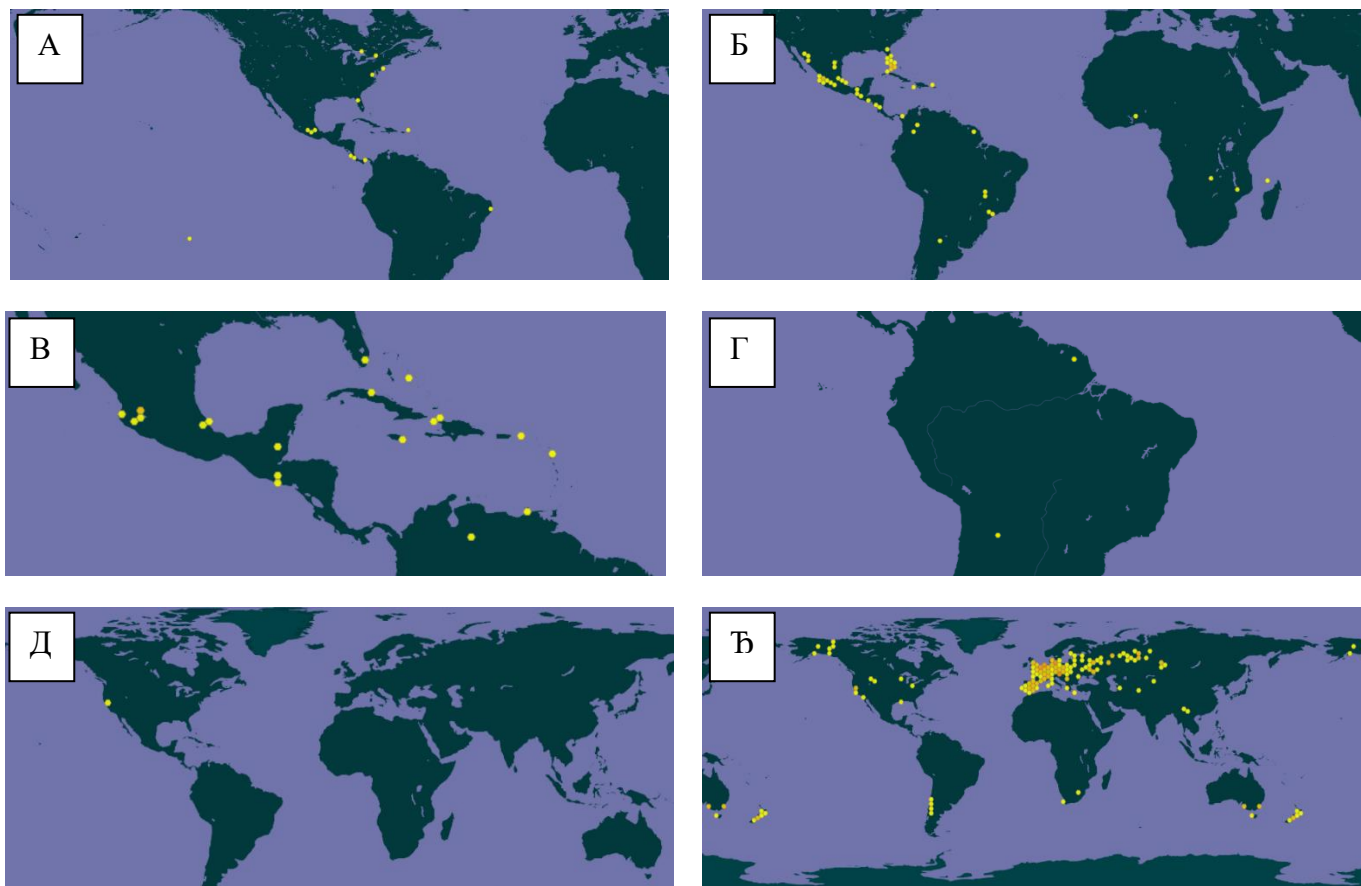
док је у бази података Mycobank описана 21 врста (Mišković *u cap.*, 2023). Међутим, испоставило се да већина описаних врста нема доступне сојеве, с обзиром да је само мали број сојева депонован у колекцијама култура (*S. commune*, *S. fasciatum*, *S. radiatum* и *S. umbrinum*). Некада су *S. commune* Fr. и *S. radiatum* Fr. сматране за конспецифичне врсте услед морфолошке сличности и сличности ITS рДНК региона, међутим, опширне генетичке анализе су утврдиле да су питању независни таксони (Sammut *u cap.*, 2019; López-Legarda *u cap.*, 2021).

Врста *S. commune* Fr. је широко призната и детаљно изучавана, док се већина описаних врста овог рода сматра синонимом ове врсте. Поред тога јасно је уочљиво широко распрострањење ове врсте као и 22 синонима по којима је детерминисана широм света од 1789. године до данас, укључујући: *Agaricus alneus* L., *Agaricus alneus* Reichard, *Agaricus*

multifidus Batsch, *Agaricus villosocanescen* Baumg., *Apus alneus* (L.) Gray, *Daedalea commune* (Fr.) P. Kumm., *Hyponevris alneus* (L.) Earle, *Merulius alneus* (L.) J.F. Gmel., *Merulius alneus* Schumach., *Merulius communis* (Fr.) Spirin, Zmitr., *Pleuropus alneus* (L.) Zawadzki, *Scaphophoeum agaricoides* Ehrenb., *Scaphophoeum agaricoides* Ehrenb. ex Wallr., *S. alneum* (L.) J.Schröt., *S. alneum* (Reichard) Kuntze, 1898, *S. alneum f. radiatum* Pilát, *S. alneum var. multifida* (Batsch) Fr., *S. alneum var. multifida* (Batsch) Fr. ex Sacc., *S. commune f. stipitatum* L. Krieg., *S. commune subsp. multifidum* (Batsch) Cooke, 1892, *S. commune var. longii* Parisi, *Schizophyllum commune var. multifidum* (Batsch) Cooke, *S. commune var. palmatum* Debeaux, *S. multifidum* (Batsch) Fr., *S. multifidum var. digitatum* Ellis & T. Macbr., *Schizophyllum communis* Fr. (Mahajan, 2022).

Студија из 1961. године каталогизирала је више од 3.714 примерака рода *Schizophyllum*, од којих је преко 96% приписано врсти *S. commune* Fr., 2% *S. fasciatum* Pat., 2% *S. umbrinum* Berk., док су четири примерка приписана *S. leprieuri* Linder, два примерка су приписана *S. brasiliense* W.B. Cooke и један *S. palmatum* Jungh. ex W.B. Cooke (Cooke, 1961). Са друге стране, студија Carreno-Ruiz *u cap.* (2019) је утврдила да је најзаступљенија врста у Мексику *S. radiatum* Fr. са 62 примерка (Слика 2, А), а затим *S. commune* Fr. са 28 примерка, док је *S. umbrinum* Berk. (Слика 2, Б) на последњем месту с обзиром на само 3 описана примерка. Врсте *S. fasciatum* Pat. (Слика 2, В), *S. umbrinum* Berk. и *S. leprieuri* Linder (Слика 2, Г) се налазе близу Карипског мора и Мексичког залива, *S. brasiliense* је пронађена у Бразилу, а *S. palmatum* Jungh. ex W.B. Cooke (Слика 2, Д) у Јапану (Cooke, 1961), док је по један забележен примерак врсте *S. amplum* (Lev.) Nakasone у Европи пронађен у Естонији и Малти (Слика 2, Ђ) (Sammut *u cap.*, 2019). Све врсте, са изузетком космополита *S. commune* Fr., су слабо истражене с обзиром да се ретко налазе у природи и имају ограничен ареал, услед чега не постоје доступни литературни подаци о њиховим биолошким активностима, као ни о хемијском саставу (Mišković *u cap.*, 2023). Међутим, диверзитет гљива у влажним тропима Мексика и Централне Америке, који представља једну од колевки биодиверзитета, није детаљно проучен, услед чега се у будућности може очекивати пораст извештаја у контексту врста из рода *Schizophyllum*. Штавише, познато је да је бар половина врста овог рода јестива и да има медицински и биотехнолошки значај,

због чега се све више пажње посвећује истраживању нових примена и потенцијала ових врста (Carreno-Ruiz *и сар.*, 2019).



Слика 2. Мапа распрострањења врста *S. radiatum* Fr. (А), *S. umbrinum* Berk. (Б), *S. fasciatum* Pat. (В), *S. leprieuri* Linder (Г), *S. palmatum* Jungh. ex W.B. Cookey (Д) и *S. amplum* (Lev.) Nakasoney (Ђ) (преузето са интернет странице Глобалног информационог центра о биодиверзитету <https://www.gbif.org/>)

2.4.1. Врста (Species) *Schizophyllum commune*

Царство: Fungi

Подцарство: Dikarya

Раздео: Basidiomycota

Класа: Agaricomycetes

Ред: *Agaricales*

Фамилија: *Schizophyllaceae*

Род: *Schizophyllum*

Врста: *Schizophyllum commune* Fr.

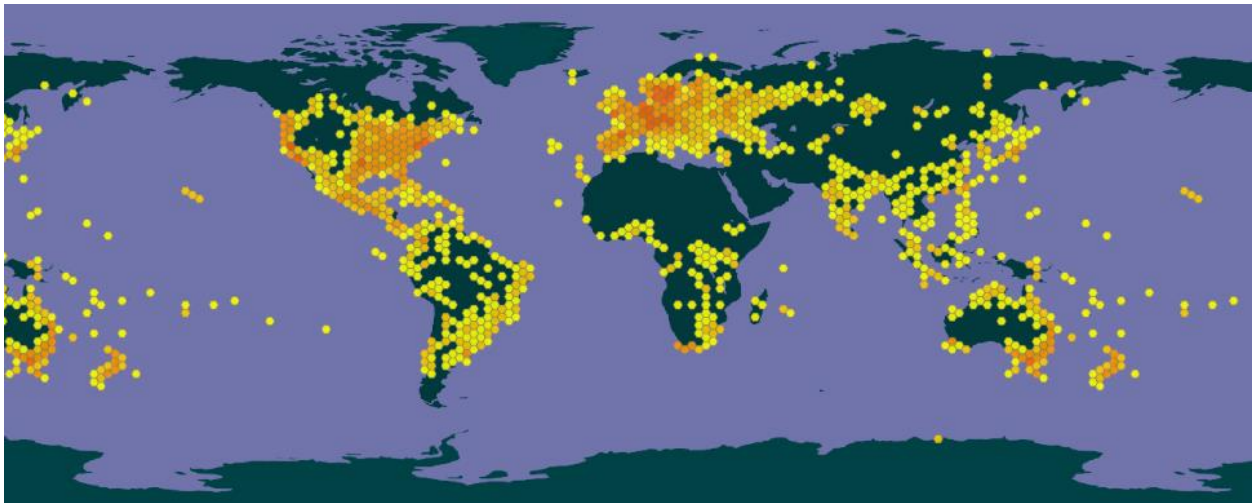
Народни назив: обична дволисница



Слика 3. *S. commune* Fr. (преузето са странице https://en.wikipedia.org/wiki/Schizophyllum_commune)

Морфолошке карактеристике: Базидиокарп је шкољкастог или лепезастог облика, величине од 1 до 6 cm. Са горње стране је зракасто наборан и покривен густим бело-сивим длачицама, док је са доње стране састављен од ламеларних набора. Уздужно подељене ламеле представљају ксероморфну адаптацију ове врсте, док се на површини ламеле формирају цилиндричне и глатке базидиспоре. Услед недостатка дршке, директно је везан за супстрат. Лако је препознатљива врста с обзиром да су ламелепопут двоструке оштрице. Месо је танко, свега 1 mm дебљине, хигроскопно и еластично, благог укуса. Мирис није изражен.

Распрострањеност и екологија: Космполитска сапробна врста, присутна на свим континентима сем на Антарктику, услед недостатка дрвећа (супстрат), али је чешћа у топлијим регионима (Webster и Weber, 2007) (Слика 4). Расте током читаве године на сувим пањевима, поваљеним стаблима и другим остацима листопадног и четинарског дрвећа. Према неким ауторима ова врста је биљни патоген који напада живо ткиво биљке са повредом (Takemoto *и сар.*, 2010), а према другим је агресиван и успешан освајач дрвећа и сврстава се у гљиве беле трулежи (Matavulj *и сар.*, 2013; Sorot и Tănase, 2019).



Слика 4. Мапа распрострањења врста *S. commune* Fr. (преузето са интернет странице Глобалног информационог центра о биодиверзитету <https://www.gbif.org/>)

Лековита својства: *S. commune* Fr. производи низ вредних метаболита, укључујући хидролитичке ензиме, биоетанол и биосурфактанте. Поред тога, документовано је да ова врста производи функционална једињења, попут полисахарида шизофилана, фенолних једињења, терпеноида и ергостерола (Kumar *и сар.*, 2022). Неутрални екстрацелуларни полисахарид шизофилан, има значајно антитуморско, антиканцерогено и имуномодулаторно дејство, повезано са његовом хеликалном структуром (Lemieszek и Rzeski, 2012). Потврђено је и интестинално антиинфламаторно дејство егзополисахарида, као и други бенефити ове врсте, попут антиоксидативних и антимикробних активности (Du *и сар.*, 2017а; Kumar *и сар.*, 2022; Mišković *и сар.*, 2023).

Јестивост: Због мале величине и кожне конзистенције, ова врста се не сматра подобном за употребу у исхрани (Matavulj *и сар.*, 2013), међутим у неким земљама, као што су Мексико, Малезија и Нигерија се сматра јестивом (Adejoye и Fasidi, 2009; Takemoto *и сар.*, 2010). Важно је напоменути да врста *S. commine* Fr. не садржи токсине (Debnath, 2017).

2.4.1.1. Биолошке активности врсте *S. commine* Fr.

Различите форме врсте *S. commine* Fr., укључујући екстракте, фракције, изолована једињења и др., су биле предмет истраживања многих студија које су испитивале разне фармаколошке активности (антиоксидативну, антимикуробну, антитуморску, имуномодулаторну и др.). Детаљан преглед забележених биоактивности у последњих 10 година приказан је у Табели 3.

Табела 3. Преглед испитиваних биолошких активности врсте *S. commune* Fr. у последњих 10 година

Порекло врсте <i>S. commune</i> Fr.	Активност	Тип екстракта/ растварача/изоливаног једињења	Референца
Малезија	Антиоксидативна	Водени	Yim <i>u cap.</i> , 2013
Малезија	Антимикробна	Метанолни, етил ацетатни, водени и дихлорметански	Mirfat <i>u cap.</i> , 2014
Филипини	Антиоксидативна	Етил ацетатни	Dulay <i>u cap.</i> , 2016
Турска	Антиоксидативна и антибактеријска	Метанолни, ацетонски, хлороформ, n-хексан	Emsen <i>u cap.</i> , 2017
Индија	Антимикробна и антиоксидативна		Debnath <i>u cap.</i> , 2017
Кина	Антиинфламаторна	Егзополисахарид (ЕПСХ)	Du <i>u cap.</i> , 2017a; Du <i>u cap.</i> , 2017b
Чешка	Имуномодулаторна	Шизофилан	Smirnou <i>u cap.</i> , 2017
Индија	Антиоксидативна, цитотоксична и генотоксична	DMSO	Kaur <i>u cap.</i> , 2018
Кореја	Антибактеријска и антифунгална	Манонеролидол, шизостатин и неролидол	Woo <i>u cap.</i> , 2019
Малезија	Антивирална		Ellan <i>u cap.</i> , 2019
Лаос	Имуномодулаторна	Чисти и фракционисани полисахариди	Yelithao <i>u cap.</i> , 2019
Тајланд	Антиоксидативна	β-гlukan	Phuket <i>u cap.</i> , 2019
Малезија	Алгицидна	/	Abdelrahman <i>u cap.</i> , 2019

Бразил	Антиоксидативна	Етанолни	Basso <i>u cap.</i> , 2020
Малезија	Антиоксидативна, анти- хијалуронидазна и анти- тирозиозна	Водени	Abd Razak <i>u cap.</i> , 2020
Грузија	Антибактеријска	/	Khardziani <i>u cap.</i> , 2020
Индонезија	Антиканцерогена	Хлороформ и етил ацетатни	Ekowati <i>u cap.</i> , 2020
Кина	Антиоксидативна и хипогликемијска	Полисахариди	Chen <i>u cap.</i> , 2020
Кина	Антиоксидативна	ЕПСХ	Deng <i>u cap.</i> , 2021
Србија и Италија	Антиацетилхолинестеразна и антиоксидативна	Полисахаридни и етанолни	Mišković <i>u cap.</i> , 2021
Индија	Антидијабетогена	Етил ацетатни	Sharma <i>u cap.</i> , 2021
Немачка	Антибактеријска и антифунгална	Сесквитерпени	Wirth <i>u cap.</i> , 2021
Филипини	Цитотоксична	Етанолни	Acanto <i>u cap.</i> , 2022
Кина	Антибактеријска	Антибиотици типа фузидана	Chen <i>u cap.</i> , 2022
Тајланд	Антиоксидативна	Шизофилан	Saetang <i>u cap.</i> , 2022

2.4.1.2. Микохемијски састав врсте *S. commune* Fr.

Микохемијски састав врсте *S. commune* Fr. је последњих година доста анализиран у контексту истраживања биоактивности екстраката ове врсте гљиве, док код неких студија недостају подаци о хемијском саставу, услед чега је тешко повезати једињења са детектованим активностима. Нутритивни профил врсте приказан је кроз укупан садржај угљених хидрата (42%), као и садржај силових влакана (30%), протеина (15,60%), масти (9%) и липида (0,40%) (Debnath *u cap.*, 2017). Поред нутритивних компоненти, анализа узорака је показала продукцију хидрофобина и β -глюкана шизофилана од стране врсте *S. commune* Fr. (Hobbs, 2005), док је микохемијска анализа етанолних екстраката врсте *S. commune* Fr. открила присуство сапонина, танина, алкалоида, флавоноида, терпеноида, протеина и угљених хидрата, као и витамина (Acanto *u cap.*, 2022; Karaman *u cap.*, 2022).

2.4.1.2.1. Примарни метаболити

Примарни метаболити су молекули прекурсори које настају у току раста и неопходни су за основне функције раста и одржавања ћелија. Они су такође извор градивних блокова за производњу секундарних метаболита и екстрацелуларних ензима. Неколико врста гљива се тренутно користи у индустрији за производњу примарних метаболита, при чему је производња лимунске киселине од стране *Aspergillus niger* један од најеминентнијих примера биотехнолошких процеса индустријског обима (Chroumpi *u cap.*, 2020). Међутим, листа комерцијално важних примарних метаболита које производе филаментозне гљиве је много обимнија и укључује између осталог и производњу шизофилана, присутног код врсте *S. commune* Fr. (Zhang *u cap.*, 2013; Chroumpi *u cap.*, 2020).

Садржај примарних метаболита код врсте *S. commune* Fr. испитан је у многим студијама, са нагласком на укупан садржај егзополисахарида (ЕПСХ). Наиме, детаљна хемијска анализа и IR спектроскопија је открила да је ЕПСХ, произведен у потопљеној култури врсте *S. commune* Fr., у ствари хетерополисахарид, састављен од угљених хидрата (89%), протеина (2,2%) и уронске киселине (7,52%), док је садржај С износио 25,84%, Н 5,45% и N 0,65% (Du *u cap.*, 2017b). Са друге стране, укупан садржај протеина (2,17%) и

амино киселина (443,84 mg/g) у воденим и органским (50% метанол, 50% етанол и 50% ацетон) екстрактима врсте *S. commune* Fr. одређен је у истраживању Al Azad и Ai Ping (2021). Утврђено је да тип растварача утиче на принос испитиваних екстраката, док је селективност зависила од јачине поларности (Al Azad и Ai Ping, 2021). Yelithao *и сар.* (2019) су утврдили хемијски и моносахаридни састав две полисахаридне фракције изоловане из *S. commune* Fr. током истраживања имуномодулаторне активности. Садржај фракција из ове студије је садржао угљене хидрате (50,30-65,80%), протеине (1,46-20,10%) и сулфате (1,33-7,01%), док је гасном хроматографијом потврђено присуство глукозе (17,00-88,20%), манозе (2,70-55,20%), галактозе (6,20-19,10%) и ксилозе (0,90-8,57%).

Шизофилан

Шизофилан представља β -глюкан, егзополисахарид изолован из врсте *S. commune* Fr. који служи као разноврсни примарни метаболит, користан у разним индустријама захваљујући својој биолошкој активности.

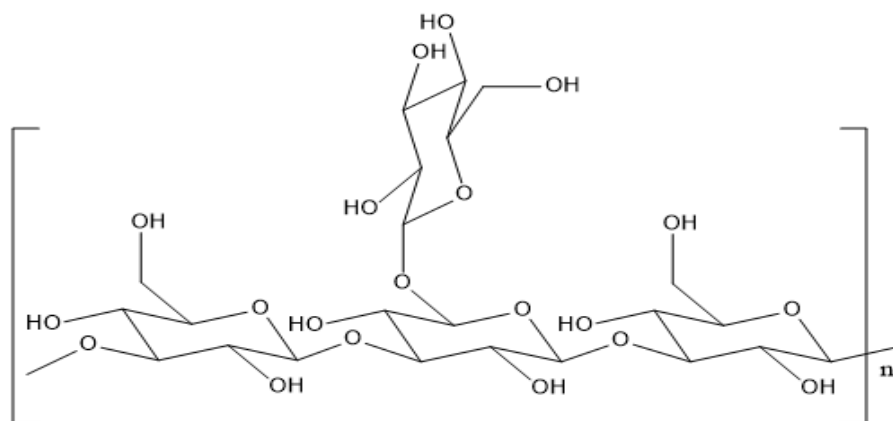
β -глюкани представљају скраћени назив за полисахариде који се састоје од β -1,3-D-глюкана са или без разгранатом β -1,6-D-глукозом. Повећана биоактивност β -глюкана може се објаснити њиховом способношћу да буду препознати од стране специфичних рецептора који се налазе на имуним ћелијама, што доводи до активације сродних ћелија које играју улогу у имунорегулацији (Meng *и сар.*, 2020). Међутим, без обзира на исту структуру, ови полисахариди могу испољити различите биолошке активности, док се јаче активности обично приписују полисахаридима који имају конформацију троструке спирале, укључујући шизофилан, склеротин, лентинан и друге (Meng *и сар.*, 2020).

Структура и производња шизофилана

Шизофилан, хомоглюкан растворљив у води, састављен је од β -(1-3)-везаног основног ланца и β -(1-6)-везаних бочних ланаца глукозе, који су присутни на приближно сваком трећем остатку (Mousaviasl *и сар.*, 2018). Тачно позиционирање бочних ланаца и њихова интеракција са основним ланцем кључни су за биолошке активности шизофилана, односно разграната структура му пружа својства попут растворљивости, гелирања и интеракције са другим молекулима. Штавише, хемијску структуру шизофилана дефинише

састав моносахарида, конфигурација и положај гликозидних веза, низ моносахарида, као и природа, број и позиција неугљено-хидратних група (Zhang *u cap.*, 2013).

Истраживања ензимске деградације открила су да се понављајућа јединица шизофилана састоји од три D-глюкопиранозна остатка која су повезана β -(1-3) везама, при чему је један од њих додатно повезан на остатак D-глюкопиранозе преко β -(1-6) везе (Слика 5) (Kikumotou *cap.*, 1971). Ова структура је готово идентична структури склероглукана, глукана који продукује гљива *Sclerotium rolfsii*, али постоје разлике у степену разгранатости и молекулској маси (Zhang *u cap.*, 2013).



Слика 5. Структура шизофилана

Хеликалну конформацију шизофилана у води су први открили Norisuye *u cap.* (1980), а затим потврдили у чврстом стању Vluhm *u cap.* (1982) студијом дифракције рендгенских зрака оријентисаних влакана. У диметилсулфоксиду (DMSO), на температурама вишим од 135 °C и рН већим од 12, трострука спирала се топи у појединачне, насумично намотане ланце, што је еквивалентно смањењу просечне молекулске масе за једну трећину (Rau, 1999). До овога долази услед цепања водоничних веза које држе троструки хеликс, а може

бити индуковано додавањем веће концентрације NaOH ($> 0,2 \text{ mol/L}$) у водени раствор шизофилана (Zhang *u cap.*, 2013).

Водоничне везе су изузетно важне, како за формирање троструког хеликса, тако и за његову деградацију. Занимљиво је да након раздвајања у појединачне ланце, трострука спирала овог полисахарида се може реформисати, што сугерише да β -гљукани са троструким хеликсом могу имати много јединствених биоактивности које су тренутно непознате (Meng *u cap.*, 2020). Са друге стране, молекулска маса може играти битну улогу када је у питању конформација овог хомогљукана, с обзиром да су Du *u cap.* (2017b) утврдили да ЕПСХ високе и средње молекулске масе, изолован из потољене културе врсте *S. commune* Fr., има троструку конформацију, док је ЕСПХ мале молекулске масе испољио конформацију насумичне завојнице.

Тренутна производња шизофилана се изводи коришћењем глукозе с обзиром да припрема неких очишћених фармацеутских и козметичких производа захтева малу количину шизофилана. Са друге стране, производња шизофилана од стране гљиве *S. commune* Fr. укључује ферментацију различитих супстрата (шећери, скроб, пиринач, кукурузна влакна, сахароза, сируп од датула и др.), док се сахароза показала као најбољи извор угљеника за максимални принос овог хомогљукана (Kumar *u cap.*, 2022). Vasso *u cap.* (2020) су утврдили да супстрат са 94% остацима грожђа је утицао на највећи принос ЕПСХ код *S. commune* Fr. пореклом из Бразила. Додатно, разни органски и неоргански извори су истражени са циљем добијања максималног приноса шизофилана, где се екстракт говедине као извор азота издвојио као најефикаснији (Kumar *u cap.*, 2022). Студије показују да примена ултрасонификације, односно ултразвучне обраде β -гљукана, представља ефикасну методологију за производњу шизофилана, с обзиром да се добију пречишћени мањи фрагменти полисахарида (мање од 0,3% протеина) који имају ниску молекулску масу и самим тим се могу применити у козметици и медицини (Zhong *u cap.*, 2015; Smirnou *u cap.*, 2017). Са друге стране, Mongkontanawat и Thumrongchote (2021) су упоредили две методе екстракције β -гљукана (екстракција топлом водом и топлом базом), и утврдили да екстракциони метод нема утицај на принос шизофилана, већ само на структуру.

Биолошке активности и примена шизофилана

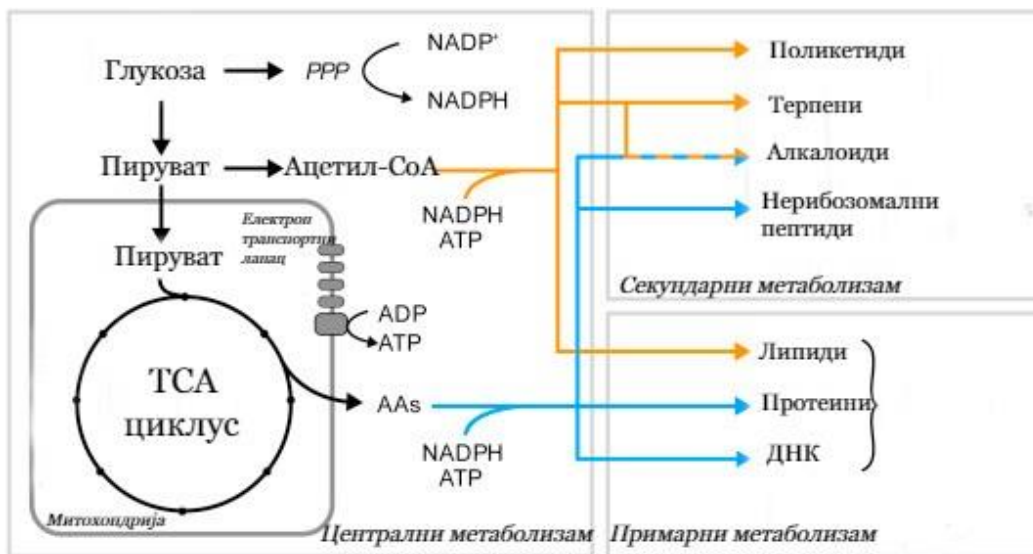
У протеклих четрдесет година, обимна истраживања шизофилана допринела су широком спектру пријављених биоактивности овог полисахарида, што је данас довело до његове огромне примене у разним индустријама (Zhang *u cap.*, 2013). Доказана је његова хепатопротективна улога, антибактеријска, антивирална и антиинфламаторна, као антинеопластична активност (Mousaviasl *u cap.*, 2018). Многе студије су потврдиле његову антиоксидативну функцију (Mongkontanawat и Thumrongchote, 2021; Saetang *u cap.*, 2022), али и његову улогу као биолошког модификатора и неспецифичног стимулатора имуног одговора (Rau, 2002; Yelithao *u cap.*, 2019), услед чега се супротставља бројним болестима, попут AIDS-а и побољшава ефекте вакцине и антитуморске терапије (Leathers *u cap.*, 2006; Zhang *u cap.*, 2013). У Јапану је био регистрован као лек против рака због своје велике клиничке ефикасности код пацијената са раком грлића материце и желуца, али је битно напоменути да је примена у фармацеутској и козметичкој индустрији ограничена услед високе молекулске масе и вискозитета овог полисахарида (Zhong *u cap.*, 2015). Шизофилан је повезан и са регулацијом хуманог имуног одговора и побољшања нивоа антитела код пацијената са хроничним хепатитисом Б, док је утврђено и да повећава имунитет шкампа против вируса синдрома белих тачака (Zhang *u cap.*, 2022).

Полисахариди углавном испољавају своје антитуморско дејство путем своје имуномодулаторне активности, што је доказано у многим извештајима (Fearon и Locksley, 1996; Soltanian *u cap.*, 2009; Ren *u cap.*, 2012). Поред тога, утврђено је да употреба ултразвучне технологије приликом припреме шизофилана представља ефикасан приступ за добијање полисахарида веће биолошке активности, као и да ултразвучно третиран шизофилан представља потенцијалну функционалну компоненту за имунорегулаторно и антитуморско лечење (Zhong *u cap.*, 2015). Полисахариди доводе до активације имуног система путем препознавања специфичних образаца рецептора на површини ћелије. β -гlukanе прво „ухвате“ макрофаги, неутрофили, моноцити, ћелије природне убице и дендритске ћелије, разграде их на мале фрагменте који се ослободе и даље их препознају гранулоцити, након чега следи уништавање ћелија тумора (Meng *u cap.*, 2020).

Шизофилан се примењује и у преради петролеја, производњи козметичких лосиона, као и оксигенпермеабилних филмова за очување хране, али најзначајнија је његова примена у фармацији захваљујући нетоксичној природи и биокомпатибилности (Zhang *и сар.*, 2013; Mousaviasl *и сар.*, 2018). Захваљујући својим физичким карактеристикама, попут формирања биофилма, термалне стабилности и високе вискозности, примењује се и као биоматеријал (Leathers *и сар.*, 2016).

2.4.1.2.2. Секундарни метаболити

Филаментозне гљиве синтетишу широк спектар природних производа, укључујући и секундарне метаболите, а најзаступљенија су фенолна једињења и флавоноиди (Karaman *и сар.*, 2012). Ова једињења представљају молекуле мале молекулске масе, који нису неопходни за раст и развој организма у лабораторијским условима, али је познато да помажу гљиви приликом конкуренције са другим организмима у природном окружењу (Shwab и Keller, 2008; Karaman *и сар.*, 2012). Штавише, утврђена је повезаност секундарног и примарног метаболизма код гљива (Слика 6), с обзиром да велики број секундарних метаболита настаје из прекурсорских молекула примарног метаболизма, попут карбоксилних киселина кратког ланца (ацетил-СоА), али и аминокиселина које се даље комбинују, модификују и формирају широк спектар секундарних метаболита (Pagare *и сар.*, 2015; Thirumurugan *и сар.*, 2018).



Слика 6. Шематски приказ повезаности примарног и секундарног метаболизма код гљива (адаптирано из Nielsen и Nielsen, 2017)

Биоактивна својства секундарних метаболита гљива нашла су широку примену у фармацији, попут производње антибиотика, агенаса за снижавање холестерола, инхибитора тумора и имуносупресива за операције трансплатације (Shwab и Keller, 2008; Karaman *и сар.*, 2012). Са друге стране, неки природни производи гљива, поготово фито- и микотоксини могу имати негативне последице по здравље људи и животиња (Shwab и Keller, 2008). Захваљујући широком утицају ових једињења, истраживање њихове биоактивности, механизма деловања и потенцијалне примене налази се у фокусу различитих области науке, укључујући биологију, фармацију, агрономију и медицину.

До данас је потврђено да екстракти *S. commune* Fr. садрже флавоноиде, сапонине, стероиде, танине, тритерпеноиде и феноле. Детаљне хемијске анализе су потврдиле присуство галне киселине, катехина, хлорогене киселине, епикатехина, кафеене киселине, кумарне киселине, рутина, кверцетина и каемпферола у етил-ацетатним екстрактима ове врсте гљиве (Kaig *и сар.*, 2018). Woo *и сар.* (2019) су поред шизостатина и неролидола, изоловали нови манозид – манонеролидол, из фракције растворене у мешавини хлороформа и метанола.

Продукција секундарних метаболита од стране ове врсте гљиве је интензивно проучавана протеклих година. Наиме, откривено је да примена различитих супстрата и начина екстракције може значајно утицати на укупан садржај фенола и флавоноида у екстрактима (Abd Razak *u cap.*, 2020; Basso *u cap.*, 2020; Boonthatui *u cap.*, 2021; Al-Salihi и Lau, 2022). Штавише, установљено је и да кокултивација са другим врстама може утицати на повећање укупног садржаја флавоноида, као одговор на стресне услове конкуренције (Pasailiuk, 2020). Wirth *u cap.* (2021) су открили да *S. commune* Fr. секретује летљиве органске компоненте, укључујући кетоне, сесквитерпене и етанол, са нагласком на сесквитерпен β -бисаболол који испољава антифунгалну активност. Поред тога, Chen *u cap.* (2020) су изоловали 16 активних компоненти типа фузидана (антибиотици) из етил-ацетатних екстраката гљиве ферментисане у чврстом стању.

2.5. Потопљене културе гљива

Култивација филаментозних гљива у потопљеним културама представља индустријски приступ производњи различитих метаболита који имају значајан друштвени и економски значај (Gibbs *u cap.*, 2000). Овакав начин узгоја обезбеђује јединствено окружење за развој гљива, а њихова способност секреције биолошки активних метаболита чини их погодним за раст у потопљеним културама (Galbraith и Smith, 1969; Agger *u cap.*, 1998). Гљиве узгајане у течним медијумима који садрже пуно хранљивих материја и у контролисаним условима формирају карактеристичне „лоптице“ мицелија које се непрестано мешају у течности (Слика 7), док њихов облик варира у зависности од врсте, где разликујемо суспендовану мицелију, пелет или грудвице (Barzee *u cap.*, 2021). Међутим, узгој у потопљеним културама често резултује и неконтролисаним растом мицелије, који може имати велики утицај на трансфер масе, брзину метаболизма и секрецију производа (Couto и Тоса-Неррера, 2007). Штавише, морфологија мицелије има огроман утицај на раст БМ и производњу метаболита, с обзиром да суспендована мицелија може повећати вискозитет медијума и смањити пренос нутријената због нењутновског реолошког понашања, док грудвице ограничавају пренос хранљивих материја услед недовољног

мешања и аерације (Barzee *u cap.*, 2021). Последично, пелет представља индустријски најпогоднији морфолошки облик БМ због побољшаног масовног преноса хранљивих материја (велике специфичне површине), ниског вискозитета бујона, малих шанси приањања на било који део реактора и др. (García-Reyes *u cap.*, 2017).

Биолошки активна једињења могу се изоловати из плодних тела гљиве, мицелије и екстрацелуларног медијума, односно филтрата (Ф). Важно је напоменути да се органска једињења из мицелијске биомасе (БМ) и Ф знатно разликују и испољавају различита својства. На производњу биолошки активних једињења утичу многи фактори, попут рН вредности, температуре, аерације и др. (Elisashvili, 2012). На пример, веће мешање може олакшати пренос масе кисеоника и хранљивих материја и довести до хомогеније расподеле хранљивих материја и топлоте, али истовремено може доћи до стварање веће силе смицања које могу оштетити пелете одсецањем спољне зоне пелета или разбијањем читавих пелета (Barzee *u cap.*, 2021). Поред тога, однос пелета и слободне мицелије утиче на брзину раста гљива, с обзиром да је утврђен позитиван ефекат на раст гљива када је у биореактору присутна доминација пелета, док рН медијума утиче на транспорт и растворљивост хранљивих материја и активност ензима (García-Reyes *u cap.*, 2017). Са друге стране, кисеоник је често ограничавајући фактор због његове ниске растворљивости у медијуму и слабе дифузије у пелет, док температура представља кључан параметар који утиче на раст гљиве, али и на друге температурно зависне параметре, попут вискозитета и концентрације раствореног кисеоника (Barzee *u cap.*, 2021). Стога је кључно одабрати одговарајуће компоненте медијума и параметре узгоја, како би се постигла оптимална БМ и лучење метаболита.



Слика 7. Потопљена култивација врсте *S. commune* Fr.

Debnath *u sar.* (2022) су истраживали осам различитих извора угљеника и седам различитих извора азота, са циљем идентификације идеалне почетне тачке за синтезу ЕПСХ из врсте *S. commune* Fr. у потопљеним условима. Резултати су указали да у присуству ксилозе и екстракта квасца је забележен највећи садржај ЕПСХ-а, док је на укупан садржај угљених хидрата најповољнији ефекат имало присуство глукозе у супстрату (Debnath *u sar.*, 2022). Штавише, многе студије су се усредсредиле на производњу полисахарида и ганодеричне киселина из потопљених култура, док је мањи број истраживања посвећен испитивању и компарацији антиоксидативних активности од стране једињења добијених из потопљених култура гљива (Elisashvili, 2012). Битно је напоменути да не постоје доступни литературни подаци о примени екстрацелуларних и интрацелуларних полисахарида добијених из потопљених култура гљива у биопрајмингу семена грашка.

2.6. Климатске промене и суша

Климатске промене подразумевају дугорочне и значајне промене у климатским варијаблама, као што су температура, ветар, падавине и снег, а сматра се да је убрзање климатских промена узроковано емисијом гасова стаклене баште (енг. „greenhouse gas“, GHG) и глобалним загревањем (Pore *u cap.*, 2022; Bibi и Rahman, 2023). Учесталост климатских екстрема, попут топлотних таласа, суше и обилних падавина које изазивају поплаве, расту на глобалном нивоу. Очекује се да ће се овај тренд наставити и додатно погоршати негативне утицаје на људске активности, као резултат климатских промена (Madadgar *u cap.*, 2017; Tamindžić *u cap.*, 2023).

Једна од најважнијих еколошких опасности која прети Европи јесте суша, сложена појава на коју утичу количина и временски распоред падавина, температура, влажност ваздуха и др. (Fiala *u cap.*, 2014). Иако суше имају потенцијал да угрозе читаву регионалну економију, пољопривредни сектор је посебно осетљив на екстремне промене, услед чега је важно подстаћи пољопривредну продуктивност. Суше су повезане са падавинама испод просека, али и са периодима изнад просечних температура, који утичу на приносе усева, смањење залиха површинских и подземних вода и погоршање хидролошког и биофизичког стреса. Поред тога, она представља најважнији лимитирајући фактор у продукцији усева (Tamindžić *u cap.*, 2023). Последишно долази до смањења прихода од продаје усева и негативног утицаја на заједнице које зависе од пољопривреде (Kuwayama *u cap.*, 2019). Управо пољопривредна производња представља један од најважнијих сектора привреде у Републици Србији, са учешћем од приближно 10% у бруто домаћем производу (БДП). Примера ради, суша у лето 2017. године која је задесила Србију значајно је утицала на пољопривредну производњу смањујући приносе кукуруза, сунцокрета, соје и шећерне репе за 30- 60%, док је укупан губитак процењен на 1,5 милијарди долара, што је имало огроман економски утицај (Mimić *u cap.*, 2022). Суша не само да наноси велике губитке у пољопривредној производњи, већ доприноси и еколошкој штети, дезертификацији земљишта и ерозији тла, услед чега се несташица воде сматра хитним глобалним и еколошким проблемом (Fang и Xiong, 2015; Tamindžić *u cap.*, 2023).

Суша има негативан ефекат на раст биљке, стабилност и проводљивост мембране, пигменте, осмотско прилагођавање и фотосинтетичку активност биљке, док су смањени приноси усева последица ефекта суше на вегетативну фазу или на репродуктивни развој, као и последица терминалног стреса на крају животног циклуса биљке (El-Saadony *u cap.*, 2017; Tamindžić *u cap.*, 2023). Клијавост семена представља прву кључну и најосетљивију фазу животног циклуса биљака, која је круцијална за успешан развој младе биљке (Petrović *u cap.*, 2016). Штавише, суша има негативан утицај на потенцијал клијања семена, што доводи до лоше клијавости, почетног пораста биљака, развоја корена и надземног дела биљке, као и до редукције нето стопе асимилације CO₂ и укупног броја и масе зрна (Tamindžić *u cap.*, 2021b). Стога, испитивање отпорности биљака на сушу у почетним фазама развоја је од виталног значаја, поготово код грашка и других махунарки, који захтевају велике количине воде током клијања, јер семена која брже клијају у условима водног дефицита могу довести до бржег формирања младих биљака, што може резултирати већим приносом (Petrović *u cap.*, 2016). Битно је напоменути да се за симулацију водног дефицита у лабораторијским условима најчешће примењује полиетилен гликол (PEG 6000), инертни осмотски агенс и метаболички неактивна компонента чији су молекули превелики да би продрли у ћелију, чиме се спречавају токсични ефекти (Tamindžić *u cap.*, 2021b).

2.6.1. Одбрамбени механизми биљака у стресним условима суше

У циљу превазилажења штетних ефеката суше у условима животне средине и обезбеђивања опстанка, биљке су развиле низ сложених заштитних механизма. Наиме, постоје 4 основна механизма: избегавање суше (*енг.* “*Drought avoidance*”), толеранција на сушу, „бежање“ од суше (*енг.* “*Drought escape*”) и опоравак од суше, док избегавање и толеранција представљају два главна механизма борбе биљака против стреса суше (Fang и Xiong, 2014). Међутим ове стратегије нису међусобно искључиве, с обзиром да у пракси биљке комбинују низ одбрамбених одговора (Chaves *u cap.*, 2003).

Стратегија избегавања суше подразумева између осталог успешну репродукцију пре наступања озбиљног стреса, али и модификацију кореновог система (Chaves *u cap.*, 2003).

Наиме, неке биљке имају способност да повећају раст корена у раној фази стреса (суше) како би апсорбовале воду у дубоком тлу. Тако формиран екстензиван коренов систем допире на већу дубину и омогућава одржавање већег водног потенцијала и дуже трајање транспирације у условима суше, што пружа даље предности за њихов раст и развој (Price *и сар.*, 2002). Додатно, оне су у стању да смање потрошњу и повећају ефикасност коришћења воде морфолошким и физиолошким прилагођавањем листова (скупљање листова, оријентација, смањење транспирације и др.), као и променом фотосинтетичког хемизма ради боље апсорпције атмосферског CO₂ (Fang и Xiong, 2014).

Са друге стране, механизам одбране од суше путем толеранције подразумева промену у садржају фитохормона и хлорофила, осмотско прилагођавање, као и антиоксидативну одбрану (Fang и Xiong, 2014). Један од најважнијих фитохормона чија је синтеза *de novo* значајно повећана у стању суше јесте апсцисинска киселина, која делује као кључни хемијски гласник у листовима и утиче на затварање стома и смањење метаболичких активности везаних за раст биљке (Peleg и Blumwald, 2011). Поред тога, утврђено је и да овај фитохормон промовише синтезу и акумулацију пролина, с обзиром да утиче на активност пиролин-5-карбоксилат редуктазе (Verbruggen и Hermans, 2008). У стању суше садржај хлорофила је смањен као последица оштећења хлоропласта (El-Saadony *и сар.*, 2017), међутим сматра се биљке које успеју да одрже већи ниво хлорофила у стресним условима су у стању да користе светлост доста ефикасније и на тај начин успешније толеришу стресне услове (Fang и Xiong, 2014).

Путем акумулације разних органских и неорганских материја, укључујући шећере мале молекулске масе (сахароза, рафининоза, трехалоза и др.), полиоле (манитол, сорбитол, инозитол и др.) и аминокиселине (пролин и γ -аминобутерна киселина), биљка смањује осмотски потенцијал и побољшава задржавање воде у ћелијама као одговор на стрес (Aswathi *и сар.*, 2021). Управо од процеса синтезе и акумулације ових осмолита зависи способност биљака да преживе дугорочни водни дефицит (Lahuta *и сар.*, 2022). Једна од главних органских материја чија је акумулација примећена у условима суше јесте пролин, протеиногена аминокиселина са α -амино групом присутном на другом амину (Dag *и сар.*, 2016). Пролин је есенцијалан за примарни метаболизам и сматра се заштитним агенсом

ензима и ћелијске структуре (Fang и Xiong, 2014), а његова повећана акумулација потврђена је и код грашка (Lahuta *u cap.*, 2022). Синтеза пролина код биљака се одвија у цитосоли и митохондријама из глутамата преко Δ^1 -пиролин-5-карбоксилата (енг. *Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate – PC5*), путем две сукцесивне редукције каталисане ензимима P5C синтетаза и P5C редуктаза (Chaves *u cap.*, 2003). Захваљујући јаким хидратантним способностима, хидрофобни део пролина везује протеине, док хидрофилни део везује молекуле воде и на тај начин омогућава протеинима већи приступ води и спречава денатурацију. Пролин такође утиче на одржавање редокс потенцијала и смањује киселост ћелије (Dar *u cap.*, 2016).

У условима суше долази и до поремећаја у динамичкој равнотежи стварања и уклањања реактивних кисеоничних врста (енг. *Reactive Oxygen Species – ROS*). Претерана акумулација ROS-а може довести до смрти ћелије услед пероксидације мембранских липида, с обзиром да су фосфолипиди и масне киселине најосетљивији на њихово присуство (Fang и Xiong, 2014). Промене у регулисању концентрације ROS-а су веома важне за сигналне реакције биљака, при чему управо ове промене диктирају правац аклиматизационог одговора биљака на стрес (Noctor *u cap.*, 2018). Због тога су биљке развиле низ софистицираних ензимских и неензимских одбрамбених механизма, укључујући супероксид дисмутазу, каталазу, аскорбат пероксидазу, глутатион пероксидазу, глутатион редуктазу, алтернативну оксидазу и др. (Apel и Hirt, 2004). Овакав комплексан антиоксидативни систем са неензимским променама концентрације секундарних метаболита је кључан за перцепцију стреса и развијање одговарајућег метаболичког одговора (Mittler, 2017).

Неензимски одговор биљака на стање стреса подразумева стварање низа секундарних метаболита, укључујући аскорбинску киселину, глутатион, каротеноиде, флаваноне, антоцијанине и др. (Blokina *u cap.*, 2003). Секундарни метаболити представљају једињења која нису суштинска за основне животне процесе ћелије или организма, али играју битну улогу у интеракцији ћелије или организма са својом околином. Ова једињења често имају функцију заштите организма од разних видова биотичког (попут напада болести и штетних организма) и абиотичког (као што су суша, висока температура и сл.) стреса (Pagare *u cap.*, 2015). До данас је описано преко 2.140.000 секундарних

метаболита, који се класификују на основу структуре, функције и биосинтезе на пет главних класа: терпеноиди и стероиди, једињења проистекла из аминокиселина и поликетиди, алкалоиди, нерибозомални полипептиди и ензимски кофактори (Thirumurugan *u cap.*, 2018). Структурна разноврсност и сложеност ових молекула омогућава биљкама да се прилагоде различитим условима и изазовима у окружењу, чиме се осигурава заштита и опстанак.

Иако секундарни метаболити показују изузетну разноврсност хемијских структура, њихова биосинтеза је директно повезана са уједињеном мрежом примарног метаболизма, док на динамику и деликатан баланс између активности ова два метаболизма утичу расти развој ћелије, као и спољашњи фактори (Thirumurugan *u cap.*, 2018). Наиме, већина ових једињења настаје из релативно ограниченог броја прекурсорских метаболита који потичу из примарног метаболизма, што је случај и код гљива (Pagare *u cap.*, 2015; Thirumurugan *u cap.*, 2018). Штавише, секундарни метаболити служе као тампон зона за смештај сувишка C и N, који се по потреби путем метаболичке дезинтеграције могу вратити назад у примарни метаболизам (Thirumurugan *u cap.*, 2018).

2.7. Грашак (*Pisum sativum* L.)

Грашак (*Pisum sativum* L.) припада биљкама породице *Fabaceae* и сматра се популарном повртарском културом и изузетно важним усевом махунарки, с обзиром да се узгаја широм света (Santos *u cap.*, 2019). Данас су махунарке одговорне за приближно трећину укупне количине протеина која се користи у људској исхрани, док грашак представља један од значајних извора протеина захваљујући високом садржају протеина, аскорбинске киселине, угљених хидрата, балансираном саставу аминокиселина и доброј сварљивости (El-Saadony *u cap.*, 2017). Најзаступљенији угљени хидрат је скроб који има низак гликемијски индекс и захваљујући лакој сварљивости скроба махунарке обезбеђују високу нутритивну вредност у исхрани људи, с обзиром да се део скробне фракције, односно отпорни (резистентни) скроб, не вари у танком цреву и функционише слично као дијететска влакна, дајући одређене здравствене предности. Поред тога, недостатак глутенских протеина у зрну махунарки је веома важан у погледу испуњавања захтева

безглутенске дијете за људе који пате од целијакије (Santos *u cap.*, 2019). Smýkalu *cap.* (2012) наводе да махунарке имају значајну улогу и у сточној исхрани, као и у производњи разних јестивих и индустријских уља.

Грашак представља једногодишњу биљку пореклом из Мале Азије и источног Средоземља, која има танку усправну или повијену разгранату стабљику, високу до 150 cm (Maxted и Ambrose, 2001). Корен је вретенасте форме, дуг око једног метра, са бројним квржицама (бактеријске квржице), док су листови парно перасти и завршавају се са једноставним или разгранатим витицама. Цветови су двополни, неправилни, беле, розе или љубичасте боје и сложени у гроздасте цвасти који расту из пазуха листова (Singh *u cap.*, 2017). Плод је дуга махуна (до 12 cm) која садржи од два до десет округластих, зеленкастих јестивих зрна, док број зрна зависи од генотипа и услова спољашње средине (Knott *u cap.*, 1987).

Таксономија грашка је и даље предмет дискусије, с обзиром да су се раније *Pisum arvense* и *Pisum hortense* сматрале посебним врстама. Данас се класификују као различити варијетети исте врсте (*P. sativum* var. *arvense* и *P. sativum* var. *hortense*), док их неки аутори сматрају различитим варијететима исте подврсте и врсте, односно *Pisum sativum* subsp. *sativum* var. *arvense* и *Pisum sativum* subsp. *sativum* var. *sativum* (Martin-Sanz *u cap.*, 2011).

Као и већину махунарки, грашак би требало гајити у плодореду, као једној од најбитнијих агротехничких и превентивних мера у заштити од болести, штеточина и корова, тако да се на исту њиву враћа тек након четири године. Грашак се мора наводњавати, с обзиром да захтева доста воде, док када су у питању минерална ђубрива, ова култура није толико захтевна. У условима континенталне климе сеје се на отвореном пољу током фебруара и марта, а технолошку зрелост достиже за 55-80 дана, у зависности од сорте (Јовићевић, 2011). Постоји више сорти грашка, док класификација зависи од више фактора, укључујући изглед зрна (глатки и наборани), узраст (ниски, средње високи и високи), дужину вегетације (ране, средње ране, средње касне и касне сорте), примену (баштенски и индустријски), као и порекло (домаће, одомаћене и стране сорте). Најпознатије баштенске сорте које се гаје на простору Републике Србије су Тамиш, Дунав и Келведон. Тамиш спада

у врло ране сорте, јер технолошку зрелост достиже за мање од 60 дана и препоручује се за пролећну сетву.

Захваљујући краткој сезони раста, пријатном укусу и нутритивној вредности, који стимулишу његову продукцију и конзумацију, повртарски грашак има дугу традицију у Србији као прерађивачка култура (Jokanović *u cap.*, 2006). Према подацима FAO (2023), повртарски грашак се у Републици Србији у 2021. години гајио на површини од 5.785 ha са просечним приносом од 4,10t/ha, док се у свету ова култура гајила на површини од 2.590.367 ha, а просечан принос је износио 7,90 t/ha.

Свежа зелена зрна грашка садрже угљене хидрате (17-22 g/100 g), скроб (20-50 g/100 g), дијететска влакна (14-26 g/100 g), протеине (6,20-6,50 g/100 g), масти (0,40 g/100 g), као и 9-10 mg/100 g калцијума, 3-5 mg/100 g натријума, 97-99 mg/100 g калијума, док садржај витамина рибофлавина износи 0,70 mg/kg, тиамина 5-6 mg/kg и фолата 0,54 mg/kg (Kumari и Deka, 2021). Santos *u cap.* (2019) су утврдили да је проценат резистентног скроба код грашка већи у односу на леблебију и сочиво што омогућава употребу ове легуминозе у дијететској исхрани. У истој студији су закључили да је мала тежина семена повезана са присуством релативно малих гранула скроба по јединици површине, што може имати утицај на капацитет хидратације и дужину кувања семена (Santos *u cap.*, 2019). Захваљујући свом саставу грашак има позитиван утицај на здравље људи, укључујући и редукуцију преваленце канцера дебелог црева, кардиоваскуларних болести, инсулинске резистенције, хроничних обољења и др. (Kumari и Deka, 2021).

Поред нутритивне примене и агрономског значаја, грашак има велики значај у очувању животне средине. Наиме, грашак представља битан ротациони усев који побољшава плодност земљишта путем фиксације азота, захваљујући симбиози са бактеријама (*Rhizobium*), које редукују атмосферски азот (N₂) до амонијака (NH₃), облика доступног биљци (Petrović *u cap.*, 2016). Управо због кратког периода вегетације и способности обogaћивања земљишта азотом, грашак представља добру предкултуру за велики број ратарских и повртарских култура (Bijalwan *u cap.*, 2018; Cervenski *u cap.*, 2020), као и међуусев с обзиром да здружено гајење (*енг. „intercropping“*) са грашком повећава принос усева и побољшава експлоатацију земљишта (Yang *u cap.*, 2018).

2.8. Квалитет семена

Семе представља кључан фактор који одређује биљну производњу, док је клијање семена једна од најкритичнијих фаза у развоју биљке, стога је основна сврха производње семена управо добијање висококвалитетног семена са добрим физиолошким, биохемијским и фитопатолошким параметрима (Milošević *u cap.*, 2010). Физички квалитет семена може се повећати специфичним процесима дораде семена, који укључују чишћење семена, уклањање оштећеног и оболелог семена, као и одвајање семена других биљних врста и корова, док генетички квалитет семена зависи од начина производње и усвојених метода производње усева (Singh *u cap.*, 2021).

Са друге стране, физиолошки квалитет семена је одређен процентом клијавости као и вигором семена, и може се побољшати различитим третманима семена. Клијавост семена представља процес који започиње имбибицијом семена и завршава се производњом нормалногизданка (ISTA, 2022), а висок проценат клијавости (близу 100%) карактеристичан за висококвалитетне партије семена (Hampton *u cap.*, 2013). Штавише, висок проценат клијавости и висок вигор семена суесенцијализира обезбеђивање бољих резултата у пољу и лабораторији, као и складиштење семена у дужем временском периоду без значајнијег губитка квалитета семена, чак иу неповољнијим условима (Singh *u cap.*, 2021). На клијавост партије семена могу негативно утицати услови којима је семе изложено током жетве, сушења, чишћења и складиштења, али до редукције може доћи и кад неповољни услови животне средине наступе у пољу током раста и развоја биљке, са нагласком на температуре, падавине и релативну влажност (Hampton *u cap.*, 2013). Примера ради, пораст и принос гајених биљака су смањени када је ограничено снабдевање водом, услед чега долази до неуједначеног ницања, слабије униформности усева и смањеног приноса (Оксу *u cap.*, 2005).

Енергија клијања и клијавост семена представљају најважније показатеље квалитета и виталности семена, поред процента атипичних изданака и садржаја воде, који одређују број биљака по хектару и утичу на принос, брзину и уједначеност ницања, као и на брзину почетног пораста биљака (Mrđa *u cap.*, 2011). Такође, показано је да величина семена у

позитивној корелацији са способношћу да клија у условима осмотског стреса (суше), као и да се овај однос разликује у различитим екосистемима (Yi *u cap.*, 2019).

У сврху испитивања квалитета семена, у првом реду клијавости семена и процене пољског ницања користи се тест клијавости. Тест клијавости је стандардизован и поновљив тест који обезбеђује оптималне услове за клијање и раст биљке у лабораторијским условима и даје неопходне резултате за ницање у пољу (Milošević и Zlokolica, 1996; Milošević *u cap.*, 2010).

2.9. Третман семена

Пољопривреда се ослања на семе, на његово клијање и почетни пораст биљака. Семе се суочава са разним изазовима од болести преко штеточина до еколошких стресова. Докле год семе може самостално да их превазиђе, шансе за успех се могу повећати путем техника побољшања семена. Третман семена један је од најефикаснијих начина за подршку клијања семена и почетног пораста биљака и смањење изазова са којим се семе суочава.

Третман семена се односи на примену биолошких, физичких и хемијских агенаса и техника које се могу применити на семе како би му се обезбедила адекватна заштита (Sharma *u cap.*, 2015a). Такође, третман семена може подстаћи здраве усеве побољшањем и промовисањем уједначеног клијања. У последње време, низ технологија за побољшање семена се користе и циљу побољшања квалитета семена, побољшања сетве семена, клијавости и почетног пораста биљака, ублажавање биотичких и едафских баријера кроз повећање вигора семена и физиолошког стања семена, а укључују две опште категорије прајминг семена и облагање семена (Sharma *u cap.*, 2015a; Afzal *u cap.*, 2020).

2.9.1. Прајминг

Последице новонасталих климатских промена, све чешће суше, у комбинацији са хемијским загађењем и повећаном употребом пестицида доводе до брзе деградације земљишта и смањења приноса усева широм света (Chakraborti *u cap.*, 2022). Стога, постоји

хитна потреба да се смањи зависност од пестицида и антимикуробних средстава, повећа органска производња и преокрене губитак биодиверзитета, без остављања негативних последица на животну средину. Са друге стране, потреба за повећањем квалитета семена и постизањем брзог и уједначеног ницања биљака постала је све већа услед суочавања са потражњом за производима високих стандарда на пољопривредном тржишту (Papparella *u cap.*, 2015).

Прајминг семена представља једноставну, сигурну, економичну и ефикасну технику за побољшање клијања семена, почетног пораста биљака и повећање приноса у оптималним условима као и у условима стреса (Dawood, 2018; Srivastava *u cap.*, 2021). То је најважнија метода физиолошког побољшања семена, која подразумева поступак хидратације семена који омогућује контролисано бубрење и индукује предгерминативни метаболизам, али спречава појаву радикуле (Lutts *u cap.*, 2016; Marthandan *u cap.*, 2020). Третман хидратације се прекида пре него што престане хидратациона толеранција.

У оквиру методе прајминга семена, имбибиција семена се врши у контролисаним условима у води или у растворима који садрже различите врсте агенаса за прајминг, након чега следи поновно сушење семена до почетне влаге и даље коришћење таквог семена у агрономској пракси. Без обзира на кратак период (2 до 48 h) самог третмана, његови ефекти могу трајати током целог животног циклуса биљке (Srivastava *u cap.*, 2021).

Успешан прајминг семена захтева контролисану хидратацију која се мора зауставити пре појаве радикуле, с обзиром да ће у супротном семе изгубити толеранцију на исушивање, а тиме и виталност (Papparella *u cap.*, 2015). Низ сложених молекуларних и метаболичких путева ограничених у временском оквиру раног клијања позната је и под термином „предгерминативни метаболизам“ (Papparella *u cap.*, 2015; Pagano *u cap.*, 2023). Утврђено је да прајминг делује на предгерминативни метаболизам семена и стимулише процесе који су кључни за квалитет семена, и потребни су не само за побољшање клијавости, већ и за побољшање отпорности младе биљке (Pagano *u cap.*, 2023). Наиме, на ћелијском нивоу, неколико активних процеса је до сада описано током прајминга, укључујући активацију ћелијског циклуса и мобилизацију протеина за складиштење, процесе везане за клијање и стимулацију клијања и репаративне процесе, као и повећање активности антиоксидативних

ензима, попут супероксид дисмутазе, каталазе и пероксидаза (Dawood, 2018). Прајминг семена повећава и униформише клијање смањивањем времена имбибиције (упијања), док литературни подаци показују да позитивно утиче и на раст и продуктивност многих усева, као и да стимулише антиоксидативну активност и минимизира липидну пероксидацију (Marthandan *u cap.*, 2020; Pagano *u cap.*, 2023).

Процес клијања семена се састоји из три фазе базиране на динамици усвајања воде, чији је период одвијања *species* специфичан, односно зависи од врсте усева (Srivastava *u cap.*, 2021; Pagano *u cap.*, 2023) (Слика 8):

1. Фаза I - иницијална брза фаза упијања (имбибиције) воде; У току почетка процеса клијања пропустљивост омотача семена и капиларност ткива физички покрећу упијање воде потребну за наставак метаболизма семена. Током ове фазе доминирају процеси репарационих механизма у циљу обнове свих оштећења (губитак ДНК конформације, конверзија аспартил остатака протеина у изоаспартил, прогресивни губитак теломерних секвенци и др.) изазваних дехидратацијом која су настала током сазревања семена (Srivastava *u cap.*, 2021). Поред тога, након репарације ДНК и митохондрија, синтетишу се протеини користећи постојећу иРНК (Dawood, 2018).

2. Фаза II – активациона (*lag*) фаза током које је водни потенцијал уравнотежен са спољашњим; Ово је фаза стабилног упијања воде током које долази до пуцања семењаче, што доводи до смањења брзине узимања воде (Pagano *u cap.*, 2023). У току имбибиције долази до акумулације ROS-а унутар семена што доводи до карбонилације складишних протеина и мобилизације резерви. Током ове фазе долази до *de novo* синтезе протеина из нових иРНК, као и до синтезе нових митохондрија које ће омогућити стварање довољно енергије за завршетак клијања. Ову фазу карактерише и повећана биосинтеза метионина, који учествује у транслацији нових протеина и делује и као прекурсор за S-аденозил метионин, једињења које стимулише главне биосинтетичке путеве за регулисање клијања семена (Srivastava *u cap.*, 2021).

3. Фаза III – фаза убрзане имбибиције, односно повећаног узимања воде; Карактеристике ове фазе укључују елонгацију ћелије, репликацију ДНК, деобу ћелије и

појаву корена (Dawood, 2018). Поред тога, долази до слабљења ткива ендосперма, експресијом протеина за ремоделирање ћелијског зида, услед чега се олакшава ницање корена и долази до кулминације успешног клијања семена (Srivastava *u cap.*, 2021).



Слика 8. Криве имбибиције семена и фазе клијања семена у непррајмингованом и прајмингованом семену (адаптирано из Marthandan *u cap.*, 2020)

Фазе I и II представљају најделикатније фазе у процесу клијања семена које су кључне за успешан прајминг семена (Dawood, 2018; Pagano *u cap.*, 2023). Трофазни образац клијања има огроман утицај на виталност семена, с обзиром да током прве две фазе семе толерише повратак на почетну влагу потребну за складиштење чак и под неповољним условима, процес познат као поновно сушење, док је фаза III превише напредна да би омогућила поновно сушење без оштећења семена (Dawood, 2018). Према трофазном обрасцу, почетак клијања је повезан са брзом синтезом РНК и протеина, како би сви репаративни процеси били завршени пре почетка репликације ДНК молекула (Dawood, 2018). Управо зато су фазе I и II најбољи периоди за примену третмана (Pagano *u cap.*, 2023),

с обзиром да прајминг обично подразумева продужавање друге фазе, као и одлагање последње фазе, што омогућава завршетак већег броја репаративних процеса, као и поновно сушење, које је неопходно у случајевима одлагања сетве (Dawood, 2018).

Неке од главних конвенционалних техника прајминга семена обухватају следеће методе:

а) **Хидропрајминг** – Током хидропрајминга семе се потапа у воду у условима оптималне температуре, са или без аерације (Paparrella *и сар.*, 2015). Међутим, хидропрајминг може довести до неконтролисаног упијања воде, пошто процес зависи од афинитета семена према води и главни изазов је пронаћи и одржавати оптималне услове температуре и влажности како би се избегла појава радикуле. Са друге стране, семе није подједнако хидрирано, што доводи до неуједначеног активирања физиолошких процеса неопходних за синхронизацију и побољшање клијања (Dawood, 2018).

б) **Прајминг чврстим матриksom** – Ова метода подразумева мешање семена са чврстим носачем који је навлажен водом у циљу успостављања жељеног потенцијала воде за ефикасан прајминг, тако да се успори имбибиција налик природном процесу рехидратације у земљишту. Најчешће се примењују хидратисани песак, тресет и вермикулит или памук које је након третмана, неопходно механички одвојити без оштећења семена (Paparrella *и сар.*, 2015; Pagano *и сар.*, 2023).

в) **Осмопрајминг** – Техника подразумева третман осмотским растворима (углавном полиетилен гликол, неорганске соли, манитол, глицерол и биљни хормони) са малим воденим потенцијалом који олакшавају контролисање узимања воде, односно ограничивају оксидативна оштећења посредована накупљањем ROS-а, тако што одлажу улазак воде (Paparrella *и сар.*, 2015). Неки аутори у оквиру осмопрајминга разликују **хемопрајминг** који подразумева прајминг семена егзогеним хемикалијама и супстанцама биљног порекла, **халопрајминг** који подразумева прајминг неорганским солима и **хормопрајминг**, односно прајминг семена фитохормонима (Pagano *и сар.*, 2023).

г) **Термопрајминг** – Третман семена на различитим температурама који се врши пре сетве у циљу побољшавања ефикасности клијања семена у неповољним условима животне средине позната је као термопрајминг (Papparella *u cap.*, 2015).

д) **Биопрајминг** – Биопрајминг семена подразумева третман семена корисним микроорганизмима попут бактерија и гљива или биоактивним једињењима изолованим из микроорганизама (Papparella *u cap.*, 2015).

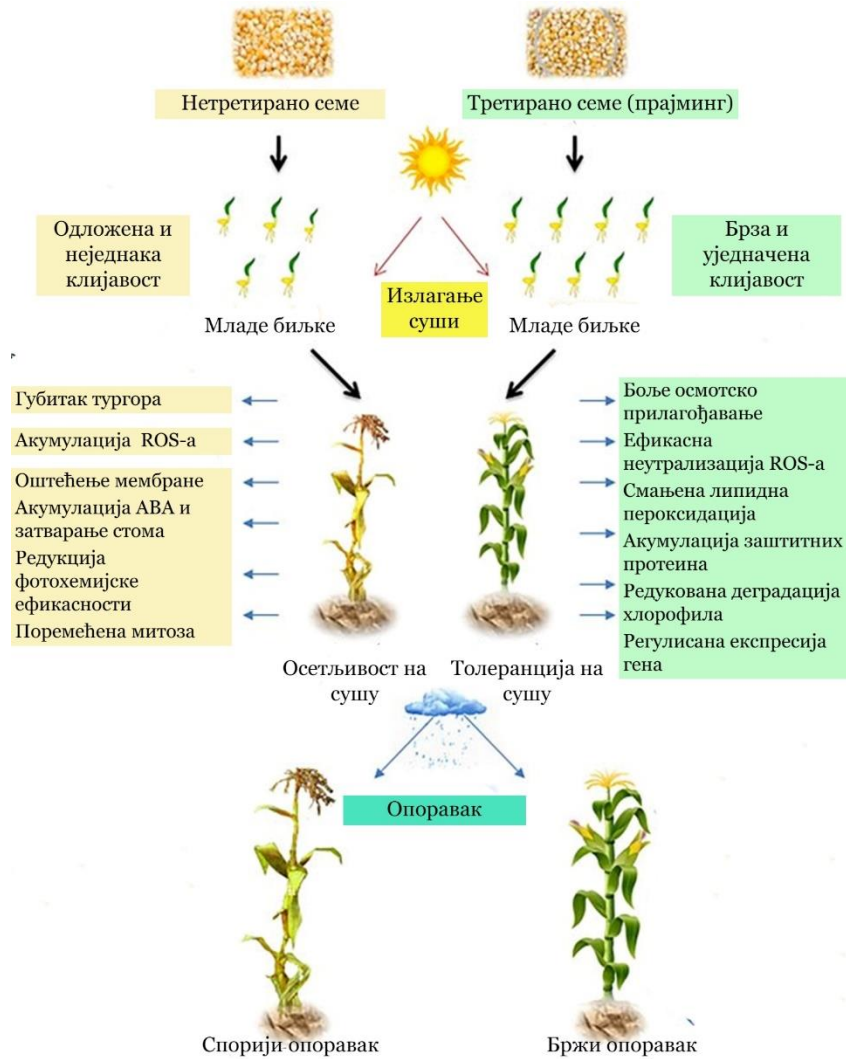
ђ) **Хибридни третмани** – Техника примене више различитих средстава за прајминг, који се комбинују и користе синергистички за повећање вишеструких нивоа толеранције на стрес код биљних култура (Pagano *u cap.*, 2023).

е) **Нанопрајминг** – Примена наночестица металних оксида у прајмингу семена представља нови алат у пољопривреди. До сада је истражена примена наночестица селена, цинк оксида, магнезијум оксида, калцијума, титанијум диоксида и др. (Pagano *u cap.*, 2023).

Иако све ове технике имају заједничку особину која подразумева делимичну предхидратацију и рану активацију процеса клијања у семену, ефикасност у многоме зависи од биљне врсте која се третира, као и од одабране методе прајминга (Marthandan *u cap.*, 2020; Pagano *u cap.*, 2023). Поред тога, прајминг семена појачава ћелијски одбрамбени одговор и побољшава толеранцију на биотичке и абиотичке стресове кроз латентну акумулацију протеина (аквапорина) који регулишу кретање воде кроз ћелијску мембрану (Marthandan *u cap.*, 2020).

У последњих пар година, поједине студије су се фокусирале на искоришћавање механизма толеранције на сушу изазваних прајмингом код различитих усева, с обзиром да је утврђено да методе прајминга семена индукују физиолошке механизме за повећање толеранције на сушу и самим тим и приноса усева под стресом суше (Слика 9) (Marthandan *u cap.*, 2020). Штавише, прајминг семена би такође могао да побољша механизме толеранције на накнадне стресове, путем механизма „меморије стреса“, где биљка изложена одређеном стресу може да изазове меморију на стрес за бољи и бржи одговор у каснијим стресним догађајима (Pastor *u cap.*, 2013). Наиме, биљке које су раније биле изложене једном типу стреса могу развити толеранцију на другу врсту стреса путем производње секундарних

метаболита (Marthandan *u cap.*, 2020), услед чега је битно утврдити и хемијски састав биљака приликом истраживања.



Слика 9. Компаративни преглед потенцијала толеранције стреса на сушу код биљака чије је семе подвргнуто прајмингу и код нетретираних биљака (адаптирано из Aswathi *u cap.*, 2022)

2.9.2. Биопрајминг

Загађење земљишта и опасност по животну средину од неселективне и прекомерне примене агрохемикалија на усеве били су кључни проблеми за данашњу пољопривреду који су довели до строгог регулаторног оквира око употребе синтетичких хемикалија услед ризика по људско здравље (Rakshit *u cap.*, 2015). Једно од најизводљивијих еколошких и економско исплативих решења, које се све више прихвата од стране потрошача, јесте употреба биоагенаса (корисних микроорганизама и њихових продуката) у подстицању раста биљака, као и побољшању квалитета семена, земљишта и усева (Chakraborti *u cap.*, 2022).

Међу различитим методама примене хемикалија, хранљивих материја и биолошких агенаса, биопрајминг семена се појавио као лак, ефикасан и практичан приступ са потенцијалом да повећа примарну продуктивност (Singh *u cap.*, 2023). Штавише, у питању је нова техника третмана семена која путем интеграције биолошких и физиолошких аспеката обезбеђује повећану отпорност семена на стрес (Mahmood *u cap.*, 2016). Једна од најважнијих предности биопрајминга јесте еколошки аспект, с обзиром да конвенционалне технике прајминга семена, попут хемопрајминга, поред тога што су скупе и отровне за биљке и људе, доводе и до нарушавања екосистема земљишта и воде. Осим тога, сматра се да биопрајминг семена представља дугорочан и синергистички приступ у решавању недостатка воде у производњи усева, где употреба микроорганизама повећава отпорност биљке на сушу путем више механизма (формирање фитохормона и органских једињења, производња егзополисахарида и антиоксиданаса, регулација осмолита и др.) (Chakraborti *u cap.*, 2022).

Новија истраживања су показала да су физиолошке и молекуларне промене на ћелијском нивоу, које укључују биохемијску модулацију, сигнализацију, промену активности транскрипционих фактора и активацију одбрамбених гена/протеина током раних фаза клијања семена, одговорне за побољшање клијавости, као и повећану толеранцију на стрес у каснијој фази раста биљке (Srivastava *u cap.*, 2021). Наиме, биопрајминг повећава производњу неких фитохормона, попут гиберелинске киселине и ауксина, који покрећу даље развој корена биљака, раст изданака и повећавају биомасу

биљке, а самим тим утичу на ублажавање абиотичког стреса (Chakraborti *u cap.*, 2022). Такође, биопрајминг стимулише синтезу протеина, фенола и флавоноида који делују као антиоксиданси, повећава ниво хлорофила, смањује ниво оксидативног стреса, и појачано регулише гене укључене у синтезу антиоксидативних ензима (Moretti *u cap.*, 2021).

Данас се у биопрајмингу семена интензивно користе многе врсте гљива и бактерија, где су се највише истакли *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Glomus*, *Bacillus*, *Agrobacterium* и *Gliocladium* (Rakshit *u cap.*, 2015). Литературни подаци су показали да биопрајминг семена грашка врстама рода *Trichoderma*, као и врстом *Pseudomonas fluorescens* позитивно утиче на клијавост и вигор семена грашка (Chanu *u cap.*, 2020; Singh *u cap.*, 2023a), као и да третман са *T. asperellum* успешно стимулише раст ове биљке (Singh *u cap.*, 2016). Додатно, прајминг семена воденим екстрактима листова врсте *Typha angustifolia* значајно је смањио негативни утицај соног стреса код грашка (Ghezal *u cap.*, 2016). Међутим, до сада не постоје доступне студије које су се бавиле утицајем биопрајминга екстрактима филаментозних гљива на клијавост семена и почетни пораст биљака и отпорност грашка на стресне услове суше.

3. ЦИЉ РАДА

Циљ истраживања докторске дисертације јесте испитивање и анализа утицаја екстракта из потопљене културе два различита соја врсте *Schizophyllum commune* Fr. (пореклом из Италије и Србије) на клијавост и квалитет семена грашка (*Pisum sativum* L.), употребом технике биопрајминга, као иновативног приступа у одрживој пољопривреди. Побољшање отпорности усева у стресним условима и унапређење еколошки одрживе пољопривреде представља и један од циљева Стратегије о пољопривреди и руралном развоју Републике Србије (2014 – 2024).

Експериментални део је подељен у две фазе. Прва фаза експерименталног дела је обухватила култивацију два соја (културе из колекције култура FUNGICULT ProFungi и Лабораторије, ПМФ, Нови Сад) у потопљеним условима и детаљну упоредну *in vitro* анализу екстракта, као и хемијску детекцију, са циљем указивања на разлике у активности и продукцији метаболита у односу на тип растварача (етанол, метанол, вода), дужину култивације, тип екстракта (биомаса/ферментациони медијум) и сој (Италија 0047/Србија 0043). Друга фаза је подразумевала биопрајминг семена грашка, испитивање утицаја полисахаридних екстракта гљиве на клијавост и квалитет семена грашка, пораст третиране биљке, као и детаљну *in vitro* антиоксидативну анализу и хемијски профил екстракта грашка након биопрајминга. Семе грашка је узгајано у условима стреса – суше и у оптималним условима ради добијања прецизније слике о утицају полисахаридних екстракта и ефектима биопрајминга.

Експериментални део истраживања је спроведен у ProFungi лабораторији на Катедри за микробиологију, Департмана за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду, као и у лабораторијама Института за ратарство и повртарство, Института од националног значаја за Републику Србију у Новом Саду. Хемијска детекција је одрађена делом на Департману за хемију, биохемију и заштиту животне средине, Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду (LC-MS/MS анализа), а делом на Институту за хемију, технологију и металургију, Универзитета у Београду (FTIR, NMR, микроанализа).

4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО ИСТРАЖИВАЊА

Експериментални део докторске дисертације је урађен у Лабораторији за микробиологију и Лабораторији за микологију Департмана за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, као и Лабораторији за испитивање семена Института за ратарство и повртарство, Института од националног значаја за Републику Србију у Новом Саду. Хемијска анализа узорака је урађена на Департману за хемију, биохемију и заштиту животне средине Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду, као и на Институту за хемију, технологију и металургију, Универзитета у Београду.

У оквиру докторске дисертације испитиван је биолошки потенцијал врсте *S. commune* Fr. Анализирана су два изолата (културе) ове врсте гљиве, различитог порекла – Болоња (Република Италија – ИТА) и Змајевац (Република Србија – СРБ). Детерминација биолошког материјала је извршена на Департману за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду. Ваучер примерци су депоновани у колекцију култура FUNGICULT у оквиру миколошке лабораторије ProFungi и заведени под следећим бројевима: 0043 (изолат из Змајевца, Република Србија) и 0047 (изолат из Болоње, Република Италија).

За потребе другог сегмента докторске дисертације огледа коришћена је рана сорта грашка (*P. sativum* L.), Тамиш, која технолошку зрелост достиже за мање од 60 дана и има праве махуне са сабљастим врхом (6 до 8 cm) са 6 до 8 формираних зрна. Зрно је доброг квалитета с обзиром на чињеницу да 80% зрна припада I (екстра финој) и II (врло финој) класи. Обзиром на раностасност има висок потенцијал родности зрна и стога је Тамиш погодна сорта за индустријску прераду и за баштенску производњу.

4.1. Молекуларна идентификација врсте – ITS секвенционирање

У циљу идентификације на основу морфологије, за сваки испитивани изолат одређена је ДНК секвенца. Материјал гљиве је претходно уситњен течним азотом (~ 100 mg), сакупљен за екстракцију укупне геномске ДНК коришћењем ZR Fungal/Bacterial DNA Mini Prep КИТ-а, према протоколу произвиђача (Zymo Research, САД). Један генски регион ITS II (интерни транскрибовани размак 1, делимична секвенца; 5.8С рибозомални РНК ген и унутрашњи транскрибовани размак 2, комплетна секвенца; и велика подјединица рибозомалне РНК ген) је амплификован (White *u cap.*, 1990). Прајмери који су се користили за амплификацију горњих региона, као и њихови одговарајући PCR профили су:

ITS1-F TCCGTAGGTGAACCTGCGGITS1 и ITS2 региони, раздвојени геном 5.8С

ITS4-RTCCTCCGCTTATTGATATGC

PCR је изведен у финалној запремини од 25 µL као што су описали Six *u cap.* (2011). Свака PCR реакциона смеша (25 µL укупне запремине) састојала се од 10,5 µL ултра чисте воде без ДНазе/РНазе (Gibco, Уједињено Краљевство), 12,5 µL Fast Gene Taq спремне мешавине са бојом 250×50 µL, 0,5 µL сваког прајмера (10 µM) и 1 µL ДНК екстракта. Услови PCR-а су били: један циклус денатурације на 95 °C током 4 min, након чега следи 35 циклуса денатурације на 95 °C током 30 sec, жарење на 52 °C током 60 sec и продужење на 72 °C током 60 sec, и један завршни циклус продужења на 72 °C у трајању од 10 min. PCR производи су пречишћени коришћењем EXTRACTME DNA CLEAN-UP КИТ-а према протоколу произвођача (BLIRT, Пољска). Пречишћени PCR производи су секвенционирани као комерцијални сервис у Eurofins Scientific-у (Немачка). За добијене секвенце су тражене хомологије са секвенцираним генима у бази података GenBank са програмом BLASTN Националног центра за биотехнолошке информације (NCBI), а сви хроматограми су ручно проверени на позицију нуклеотида. Уређене и референтне секвенце сојева из GenBank базе података су усклађене коришћењем CLUSTAL W имплементираног у софтверу BioEdit 7.2.5.

Филогенетска стабла су конструисана у софтверу MEGA 11.0.13 коришћењем методе спајања суседа на основу матрице парних растојања добијене Кимура двопараметарским моделом супституције нуклеотида. Топологија стабала је процењена методом поновног узорковања са 1.000 понављања.

4.2. Припрема екстраката гљиве *S. commune* Fr.

4.2.1. Изолација мицелије и гајење у потопљеним културама

Исечци мицелије оба испитивана соја из колекције култура пребачени су на стерилне петри плоче са сладним агаром (Торлак, Србија). Сваки изолат је рађен у три понављања. Током инкубације од 12 дана на температури од +26°C (ED 115, Binder GmbH, Немачка) праћен је раст гљиве мерењем пречника раста мицелије.

Након инкубационог периода, припремљен је стерилни ферментациони медијум (Табела 4). Потом је по 100 mL течног медијума пребачено у ерленмајере запремине од 500 mL, након чега је у сваки ерленмајер додато по 5 плагова одговарајуће мицелије чисте културе (ИТА и СРБ), димензија 1x1 cm, ради формирања потопљене културе.

Даља инкубација потопљених култура је вршена у термостатираној тресилици (ИКА, KS 4000, Немачка), на температури од +26 °C и бројем обртаја од 120 obrt/min. Култивација у потопљеној култури је континуирано праћена, на сваких 7 дана (7, 14, 21 и 28 дан) инкубације са тресилице су склоњена по 4 ерленмајера (два ИТА и два СРБ). Након ове фаза уследила је филтрација (вакуум пумпа, *Diaphragm vacuum pump* GM – 0.5; филтер папир, Whatman, No. 1) у циљу раздвајања биомасе мицелије (БМ) и екстрацелуларног медијума, односно филтрата (Ф). БМ је затим заједно са филтер папиром пребачена у стерилне петри плоче, а Ф је сипан у тамне стерилне бочице. Ф и БМ су потом одложени су у замрзивач на -20 °C током 48 h, након чега је уследила лиофилизација (-80 °C, вакуум, Christ, Alpha 2-4 LD plus, Немачка) узорака у трајању од 48 до 72 h, до постизања суве масе. Масе лиофилизованих узорака су измерене на аналитичкој ваги и забележене (Ohaus explorer, ex 224M), док је маса биомасе мицелије додатно спрашена помоћу блендера (ИКА, A11 basic,

Немачка). Наредни корак је подразумевао припрему екстраката (етанолних – ЕТ, метанолних – МЕ и полисахаридних – ПСХ), при чему су припремљени екстракти БМ и Ф оба изолата након 7, 14, 21 и 28 дана.

Табела 4. Састав ферментационог медијума

Назив хемикалије	Количина (g)
Пептон	8,50
Глукоза	59,50
Малтоза	2,66
Фруктоза	2,66
Ксилоза	2,66
Квашчев екстракт	8,50
K ₂ HPO ₄	1,70
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,85
витамин В1	0,08
dH ₂ O	1600 mL

4.2.2. Припрема етанолних и метанолних екстраката

Лиофилизирани узорци масе од 0,50 до 1 g су екстраховани у 50 mL 80% етанола (J.T. Baker™ Ethanol Absolute, 99.90%) на тресилицы (IKA, KS 4000, Немачка) на собној температури, 100 obrt/min, у трајању од 72 сата, а затим профильтрирани и упаравани на ротавапору (Buchі, R-210, Швајцарска) до +50 °C. Упарени суви остатак сваког узорка је растворен у 80% етанолу, при чему су припремљени основни раствори концентрације 100, 200 и 400mg/mL. Екстракти су пребачени у стерилне пластичне тубице (Eppendorf Tube, Немачка), затворени парафилмом, обележени и остављени у замрзивач (-20 °C) до даље употребе.

Припрема МЕ екстраката је подразумевала идентичне кораке као припрема ЕТ екстраката, са изузетком растварача, односно уместо 80% етанола, коришћен је 70 %

метанол за екстракцију лиофилизованих узорка и растварање упареног сувог остатка. Припремљени су основни раствори следећих концентрација: 400, 200, 100 и 50 mg/mL.

4.2.3. Припрема полисахаридних екстраката

Леофилизовани узорци су екстраховани у 80% етанолу (однос 1:10) на термостатираном шејкеру (ИКА, KS 4000, Немачка), у трајању од 1 h (100 obrt/min; +26 °C), након чега је уследила филтрација и екстракција талога у дестилованој води на магнетној мешалици (Velp Scientifica, Италија) у трајању од 2 h (150 rpm, 80 °C). Након центрифугирања (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Немачка), 4.000 rpm, 15 min, талог је одбачен, а супернатант профилтриран и концентрован леофилизацијом до трећине укупне запремине. Уследио је корак преципитације са апсолутним етанолом (96%) у односу 1:5 на +4 °C преко ноћи, а затим центрифугирање (12.000 rpm, 15 min) и хидрирање талога у дестилованој води. Узорак је затим дијализован у цреву за дијализу, леофилизован и растворен у dH₂O уз помоћ ултразвучног купатила (Elektromedicina, Љубљана, Словенија), при чему су добијени ПСХ екстракти концентрације 50 и 20 mg/mL.

4.3. Детерминација антиоксидативне активности гљиве

Антиоксидативни капацитет СРБ и ИТА екстраката гљиве *S. commune* Fr. одређен је помоћу стандардних *in vitro* спектрофотометријских метода који се заснивају на праћењу промена апсорбанци и боје узорка на карактеристичним таласним дужинама специфичним за сваки тест (Multiskan GO Thermo Scientific, Финска). Позитивна контрола је укључивала различите комерцијално доступне стандарде специфичне за сваку методу, док је као контрола коришћен одговарајући растварач (dH₂O или 80% етанол).

4.3.1. Детерминација капацитета „хватања“ DPPH радикала

Основни принцип DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) теста је базиран на способности компонента екстракта да изазову неутрализацију DPPH• и његов прелазак у редуковану форму (DPPH-H), која се манифестује трансформацијом љубичасте боје стабилног DPPH радикала у жуту боју редуковане форме (Espin *и сар.*, 2000). Неутрализација се одвија путем два механизма. Први механизам се објашњава предајом Натома DPPH радикалу од стране фенолне компоненте екстракта, при чему долази до настанка редуковане форме односно DPPH-H облика и арилокси радикала, који је резонантно стабилизован. Други механизам обухвата реакцију арилокси радикала са још једним DPPH радикалом, при чему долази до кондензације и њиховог преласка у неутралан молекул.

Интензитет апсорбанци је прочитан спектрофотометријски на 515 nm након инкубације у мраку у трајању од 30 min. Резултати су изражени као средња вредност три одређене IC₅₀ вредности ± стандардна девијација (СД) (µg/mL), и приказују концентрацију екстракта неопходну за неутрализацију 50% DPPH радикала.

4.3.2. Детерминација капацитета „хватања“ ABTS радикала

Капацитет хватања ABTS радикала детерминисан је у складу са методом коју су модификовали Агнао и сарадници (2001) која се заснива на формирању ABTS•⁺ оксиданта као последица реакције оксидације амонијум-персулфата и ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Трансформација плаво-зеленог катјонског радикала у неутралну безбојну форму се прати спектрофотометријски на таласној дужини од 734 nm.

Основни раствор ABTS⁺ је произведен директном реакцијом 7 mMABTS раствора са 2,45 mM K₂S₂O₈ након инкубације у мраку (12-16 h, собна температура). На дан рада припремљен је радни раствор разблаживањем основног раствора у етанолу да би се постигла апсорбанца између 0,500 и 0,900 на таласној дужини од 734 nm. Запремина од 10 µL екстракта је помешана са 290 µL радног ABTS раствора и апсорбанца је прочитана након

инкубације у трајању од 5 min. Стандардна калибрациона крива раствора тролокса (Т) је коришћена за анализу резултата, који су представљени као mg екв. Т/g суве масе (с.м.).

4.3.3. Детерминација капацитета „хватања“ ОН радикала

Капацитет „хватања“ хидроксил радикала (ОН•) који настаје у Фентоновој реакцији се заснива на мониторингу реакције деградације деоксирибозе методом Gutteridge-а (Halliwell *и сар.*; 1987). Хидроксил радикали покрећу реакцију одузимањем водониковог атома 2-деоксирибози у аеробним условима, и при томе формирају малондиалдехид (MDA) који улази у реакцију са тиобарбитурном киселином (ТВА). У епрувете је додато 100 μL 0,015% раствора H_2O_2 , 100 μL 10 mmol/L раствора FeSO_4 и 100 μL 0,05 mol/L раствора 2-деокси-Д-рибозе помешано са различитим концентрацијама испитиваних екстраката (10 μL) и 2,7 mL фосфатног пуфера, рН 7,4. Узорци су инкубирани 60 min на 37 °C, након чега су у смешу додати 0,1 M EDTA (200 μL) и ТВА реагенс (2 mL) који представља микс 5,2 mL перхлорне киселине, 1,50 g тиобарбитурне киселине и 60 g трихлорсирћетне киселине растворених у 400 mL дестиловане H_2O . Загревање је вршено на 100 °C у трајању од 10 min, а након хлађења по 200 μL реакционе смеше пребачено је у микротитар плоче. Промена апсорбанце је измерена на таласној дужини од 532 nm (ружичасти комплекс), а резултати су изражени као средња вредност три одређене IC_{50} вредности \pm СД ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.3.4. Детерминација капацитета „хватања“ супероксид анјон радикала

Капацитет „хватања“ супероксид анјон радикала ($\text{O}_2 \bullet^-$) од стране анализираних етанолних екстраката евалуисан је помоћу спектрофотометријске методе описане у раду Nishikimi *и сар.* (1972). Метода се базира на мерењу способности екстракта да неутралише $\text{O}_2 \bullet^-$ радикале који настају као последица аеробне реакције нитроблу-тетразолијума (NBT) и NADH која се дешава у присуству феназинметилсулфата (PMS), који је преносилац електрона и утиче на механизам редукције. Због сличности са флавином PMS у реакцији са NADH прелази у редуковану форму (PMSH), а реоксидацијом услед аеробних услова ствара се $\text{O}_2 \bullet^-$ радикал који редукује NBT у формазан.

Оксидована форма NBT нема боју, док је редукована (NBTH) плаве боје и додаток екстракта који садржи феноле утиче на смањење редукције NBT реагенса и неутрализације супероксид анјон радикала што се мери спектрофотометријски (560 nm) након инкубације од 5 min. Резултати су приказани као средња вредност три израчунате IC₅₀ вредности ± СД (µg/mL).

4.3.5. Детерминација капацитета „хватања“ NO радикала

Тест је заснован на спектрофотометријском мерењу неутрализације нитритних јона који настају у реакцији кисеоника и NO радикала (у условима физиолошког pH), који се формирају из воденог раствора натријум нитроприсида (SNP). Метода подразумева детерминацију концентрације нитритних јона (Green *и сар.*, 1982), који уз додаток Griess - овог реагенса формирају пурпурно-ружичасти диазо комплекс. Реакциона смеша је садржала 15 µL екстракта, 250 µL 10 mmol/L SNP-а и 250 µL фосфатног пуфера (pH 7,4). Након инкубације (90 min, собна температура, константно осветљење) додато је 500 µL Griess-овог реагенса (смеша 0,2% раствора N-(1-нафтил)-етилендиамин дихидрохлорид и 2% раствора сулфаниламида у 4% фосфорној киселини). Апсорбанца је измерена на 546 nm, а као стандард коришћен је пирогалол (PG). Капацитет хватања радикала је изражен као средња вредност три детерминисане IC₅₀ вредности ± СД (µg/mL).

4.3.6. Детерминација редукционог потенцијала применом FRAP теста

Редукциони потенцијал екстраката гљива детерминисан је помоћу FRAP (*енг. Ferric Reducing Antioxidant Power Assay*) методе коју су описали Benzie и Strain (1999), базираној на редукцији Fe³⁺ у Fe²⁺ у условима ниске pH вредности. У току реакције долази до формирања плаво обојеног комплекса Fe²⁺- TPTZ (гвожђе(II)-2,4,5-трипиридил-S-триазин) који граде феро јони са присутним лигандом, а чија се апсорбанца мери спектрофотометријски на 593 nm након инкубације од 6 min. 225 µL свежег FRAP реагенса (мешавина 10 mmol/L TPTZ раствора у 40 mmol/L HCl, 0,02 mmol/L FeCl₃·6H₂O и ацетатног пуфера pH (pH 3,6) у односу 10:1:1) је додато у микротитар плочу, заједно са 10 µL екстракта

и 22,5 μL дестиловане H_2O . Као стандардно једињење коришћена је аскорбинска киселина (АК) и на основу калибрационе криве стандардног раствора прерачунати су резултати који су изражени као средња вредност три мерења \pm СД (mg ек. АК/g с.м.).

4.4. Детерминација антимицробне активности гљиве

4.4.1. Детерминација антибактеријске активности екстраката гљиве

Антибактеријска активност МЕ екстраката гљиве *S. commune* Fr. испитана је микродилуционом методом према CLSI стандарду (Limbago, 2001). Детерминација минималне инхибиторне концентрације (МИК) и минималне бактерицидне концентрације (МБК) рађена је у складу са CLSI протоколом применом двоструког разблажења (Weinstein *и сар.*, 2012; Караман *и сар.*, 2009). Припрема је укључивала стерилизацију неопходног прибора и материјала у аутоклаву (121 $^{\circ}\text{C}$, Fedegari, Италија): епрувете, физиолошки раствор (0,9 % NaCl), дестилована вода, Müller-Hinton бујон (МНВ), Müller-Hinton агар (МНА), наставци, празно посуђе и остали прибор.

Бактеријске културе две Грам позитивне (*Staphylococcus aureus* 6538 и *Bacillus cereus* 11778) и две Грам негативне (*Escherichia coli* 11775 и *Pseudomonas aeruginosa* 9027) бактерије су из колекције засејане на МНА и инкубиране на 37 $^{\circ}\text{C}$ током 24 h. Припремљени су и раствори антибиотика (канамицин, хлорамфеникол, ампицилин и стрептомицин), у распону концентрација од 0,50 до 0,03 mg/mL (односно од 0,05 до 0,003 %). Распон разређења испитиваних МЕ екстраката био је од 100 mg/mL до 6,25 mg/mL (односно од 10% до 0,625 %).

Први дан теста направљена је суспензија бактеријске културе турбидитета 0,5 McFarland-а који одговара бројности бактерија од 2×10^8 CFU/mL (*енг.* CFU – Colony Forming Units), која је затим разблажена још 100 пута да би се добила бројност бактерија од 10^6 , додавањем 50 μL одговарајуће суспензије и 4.950 μL МНВ у стерилни суд. У стерилним микротитар плочама су направљена разблажења одговарајућих концентрација, након чега је у сваки бунарчић који представља радне пробе додато 50 μL мешавине суспензије и МНВ.

У плејтовима су такође испитиване три врсте контрола, контрола раста (50 μL неинокулисаног МНВ и 50 μL dH₂O), екстракта (50 μL неинокулисаног МНВ и 50 μL екстракта) и растварача (50 μL растварача, 50 μL неинокулисаног МНВ и 50 μL dH₂O). Плејтови су затим пребачени на инкубацију у термостат (24 h, +37 °C). Након инкубационог периода, прочитан је МИК – концентрација екстракта/антибиотика присутна у првом бунарчићу без замућења. У циљу боље видљивости МИК-а, по 10 μL 1% TTC-а (Carl Roth, Немачка) је додато у сваки бунарчић (он има улогу да обоји ћелије у ружичасто-црвену боју), а затим је након инкубације (2 h, 37 °C) прочитан је МИК као прва концентрација екстракта/антибиотика присутна у величини која нема обојење. После читавања, МИК су пресејане на МНА у петри плоче, обележене и инкубиране (24 h, +37 °C), након чега је уследило бројање израслих колонија и читавање МБК. Оптималан број колонија је 30-300 (CFU/mL), а свака концентрација која је имала мање од 30 израслих колонија је сматрана да је МБК.

4.5. Детерминација анти-ацетилхолинестеразне активности гљиве

Анти-ацетилхолинестеразна активности полисахаридних и етанолних екстраката гљиве утврђена је применом колориметријске методе по Ellman-у (Ellman *u cap.*, 1961) заснованој на утроску супстрата и ослобођеног тиохолина, током хидролизе ацетилхолина од стране ацетилхолинестеразног ензима – АChE (Sigma Aldrich, Merck Group, Немачка). Као вештачки супстрат коришћен је ацетихолинјодид (Sigma Aldrich, Chemie GmbH-Schnelldorf, Немачка), пореклом из електричне јегуље, који под дејством АChE ензима се разлаже на тиохолин и ацетат. Тиохолин у реакцији са 5,5' дитиобис-2-нитробензоевом киселином (DTNB) формира жуто-наранџасто једињење, услед присуства жутог анјона 5-тио-2-нитробензоеве киселине, док јачина обојења се мери спектрофотометријски. Примењени биохемијски есеј не захтева припрему животињског тиква за *in vitro* анализу, али је метода лимитирана само на узак опсег рН вредности (6,50 – 8,50) који представља средину у којој долази до прекида дисулфидних веза у DTNB.

Реакциона смеша је укључивала 20 μL одговарајућег екстракта гљиве, 150 μL реагенса А (Ellman-ов реагенс и ацетилхолинјодид) и 50 μL реагенса Б (АChE 518 U/mL, растворен у фосфатном пуферу, рН 8,00), док је донепезил (Donesert, Здравље, Лесковац, Република Србија) концентрације 1 mg/mL коришћен као позитивна контрола. Све је рађено у три понављања, док је концентрација испитиваних екстраката била у опсегу од 10 до 0,01 %. Апсорбанца је мерена на таласној дужини од 412 nm, са укупно 15 мерења у интервалу од 1 минуте. Процент ензимске активности је израчунат на основу следеће једначине:

$$I_{\text{AChE}} (\%) = (1 - A_{\text{узорка}} / A_{\text{контроле}}) \times 100\%$$

где, $A_{\text{узорка}}$ и $A_{\text{контроле}}$ представљају апсорбанце узорака и контроле.

Резултати су изражени као IC_{50} и IC_{90} вредности, то јест као концентрација узорка која неутралише 50%, односно 90% ензима АChE, где мања бројчана вредност указује на јачу инхибиторну активност. Као референтно време инхибиције узет је временски период од 10 min.

4.6. Микохемијска карактеризација гљиве

4.6.1. FTIR анализа

FTIR спектри ЕТ и ПСХ екстракта гљива снимљени су на спектрофотометру Thermo-Nicolet Model 6700 (Thermo Scientific, САД) опремљеном Smart Orbit (Diamond) ATR прибором и софтвером OMNIC 7.3. Спектри су снимљени у опсегу таласних бројева од 400–4000 cm^{-1} .

4.6.2. Хидролиза

За анализу моносахаридног састава ПСХ екстракта примењена је папирна хроматографија. Сваки лиофилизоване ПСХ екстракт (2 mg) је хидролизован са 2М ТФА (2 mL) у затвореној епрувети на 100°C преко ноћи. Узорци су концентровани испаравањем под смањеним притиском (испод 50 °C) до суве материје. Преостали ТФА је уклоњен помоћу два циклуса испаравања са 0,5 mL изопропанола, а коначни остатак је растворен у 0,02 mL дестиловане воде и анализиран на Whatman No.1 хроматографском папиру (десцендентна метода) у систему растварача етил-ацетат:пиридин:вода(10:4:3 v/v/v). Компоненте су визуелизоване алкалним нитратом сребра (Charlin и Kennedy, 1986). D-галактоза, D-глукоза, D-маноза, D-ксилоза и D-рибоза су коришћени као стандарди.

4.6.3. Детерминација садржаја укупних протеина

Садржај протеина у екстрактима гљива испитан је помоћу методе по Lowry-ју (1951), заснованој на редукцији Folin-Ciocalteu-овог реагенса (Carlo Erba, Италија) уз помоћ бочних остатака тирозина. Апсорбанца је очитана на таласној дужини од 740 nm, док је концентрација протеина очитана са стандардне криве раствора BSA (енг. *Bovine Serum Albumin*), а резултати су изражени у mg ек. BSA/g с.м.

4.6.4. Детерминација садржаја угљених хидрата

Садржај угљених хидрата у екстрактима гљиве одређен је помоћу модификоване колориметријске методе у микротитар плочи (Masuko *и сар.*, 2005), која је описана од стране Monsigny-ја *и сар.* (1988). Тест је заснован на одређивању садржаја угљених хидрата уз помоћ фенол-сумпорне киселине (PSA) која утиче на реорганизацију моносахарида, олигосахарида и полисахарида у фурфуралне деривате који стварају обојена једињења.

Метода је оптимизирана у односу на време „шетања“ и запремину H_2SO_4 и фенола, док је апсорбанца мерена спектрофотометријски на таласној дужини од 490 nm. Стандардна крива глукозе коришћена је за детерминацију садржаја укупних угљених хидрата, а резултати су приказани као mg ек. глукозе (ГЛУ)/g с.м.

4.6.5. Детерминација садржаја укупних фенола

Садржај укупних фенола је одређен по методи заснованој на реакцији фенола са Folin-Ciocalteu-овим (FC) реагентом (Carlo Erba, Италија) приликом које долази до формирања обојеног комплекса (Na_2CO_3 боји комплекс у плавозелену боју) чија се апсорбанца мери на 760 nm након инкубације у трајању од 2 h (Singleton *и сар.*, 1999). Испитивани екстракти гљиве су били у распону концентрација од 0,625 до 50 mg/mL, док је концентрација стандарда припремљена у концентрацији између 0 и 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. У микротитар плочу је додато 25 μL испитиваног екстракта, односно стандарда, сем у слепу пробу где је додат само растварач (етанол). Након тога у смешу је додато 125 μL 0,1 mol/L FC реагенса и помешано са 100 μL натријум карбоната (7,50%) након 10 min. Гална киселина (ГК) је коришћена као стандард за цртање калибрационе криве (функција апсорбанце у зависности од концентрације), док је садржај укупних фенола у екстракту изражен као средња вредност три мерења \pm СД (mg ек. ГК/g с.м.).

4.6.6. LC-MS/MS анализа

Квантификација одабраних фенолних једињења полисахарадних и етанолних екстраката изолата *S. commune* Fr. одрађена је користећи благо модификовану верзију LC-MS/MS приступа (Orčić *u cap.*, 2014). Пошто су праћени само јони релевантни за циљане анализе, коришћен је режим праћења одабраних реакција (SRM) да би се постигла висока селективност и осетљивост. Течни хроматограф Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution куплован са G6410 QqQ MS-MS детектором са електроспреј јонским извором и контролисаним од стране MassHunter вер. В.03.01. софтвера (Agilent Technologies) коришћен је за анализу екстраката и стандарда. Такође је коришћена течна хроматографија високих перформанси серије Agilent Technologies 1200.

Једињења су раздвојена на Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm x 4.6 mm, 1.8 m) колони за брзу резолуцију која се одржава на температури од 50 °C. Мобилна фаза је испоручена брзином протока од 0,5 mL/min (уместо 1 mL/min) у режиму градијента (0 min 30% B, 12 min 70% B, 18 min 100% B, 24 min 100% B, време поновног еквилибрације 6 min, уместо 0 min 30% B, 6 min 70% B, 9 min 100% B, 12 min 100% B, време поновне еквилибрације 3 min). Елуирана једињења су детектована помоћу MS, коришћењем следећих параметара извора јона: небулизациони гас (N₂) притисак 40 psi, гас за сушење (N₂) проток 9 L/min и температура 350 °C, капиларни напон 4 kV, негативан поларитет. Подаци су добијени у динамичком MRM режиму, користећи оптимизоване параметре специфичне за једињење (време задржавања, јон прекурсора, јон производа, напон фрагментора, напон судара). Калибрациони стандарди (0,0015-25,00 µg/mL концентрације) су припремљени поступним разблаживањем (1:1) основног микса концентрација 100 µg/mL смешом метанол-вода у односу 3:7. За сва једињења, површине пикова су одређене коришћењем софтвера Agilent MassHunter Workstation софтвер Qualitative Analysis (вер. В.03.01.). Уцртане су калибрационе криве и концентрације узорача израчунате помоћу софтвера OriginLabs Origin Pro (вер. 9.0).

4.7. Скрининг и селекција екстраката гљиве за биопрајминг семена грашка

У циљу селекције најперспективнијих екстраката гљиве *S. commune* Fr. оба соја за биопрајминг семена грашка (*Pisum sativum* L.) одрађен је предтест, односно скрининг који је подразумевао биопрајминг семена грашка етанолним и полисахаридним екстрактима и испитивање квалитета семена и почетног пораста биљака грашка. За биопрајминг изабрано је семе сорте Тамиш. Добијени резултати скрининга су одредили даљи ток експерименталног дела докторске дисертације.

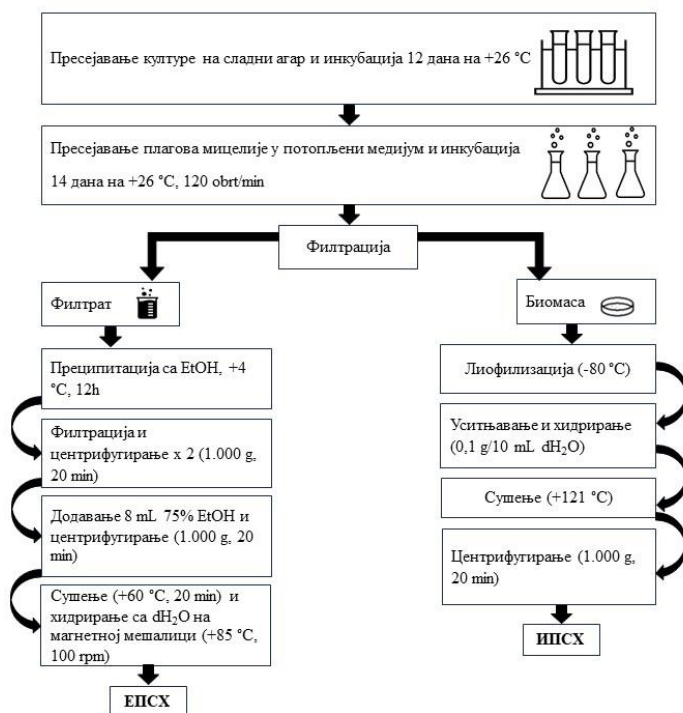
4.8. Припрема полисахаридних екстраката за биопрајминг – егзо- и интраполисахарида

Припрема ПСХ екстраката је урађена по методи описаној у раду Chen-a *и сар.* (2020) уз одређене модификације (Слика 10). ПСХ екстракти оба соја врсте *S. commune* Fr. су припремљени на идентичан начин и подразумевали су истовремену припрему егзо (из Ф) – ЕПСХ и интраполисахарида (из БМ) – ИПСХ. Први корак је био пресејавање одговарајућег соја гљиве из колекције културе (ИТА и СРБ) на сладни агар и култивација у термостату током 12 дана (26 °C), а затим је уследила припрема течне подлоге (рецептура описана у Поглављу 4.2.1.) и пребацивање по 5 плагова (1x1 cm) у 100 mL течног медијума. Култивација у потопљеном медијуму на термостатираној тресилици (120 obrt/min, 26 °C; ИКА, KS 4000) је трајала 14 дана, након чега су узорци филтрирани у циљу раздвајања Ф и БМ.

Уследила је преципитација ЕПСХ из Ф додавањем 5 пута веће запремине апсолутног етанола (95%) у односу на количину Ф, након чега је смеша одложена у фрижидер преко ноћи (+4 °C). Након тога ЕПСХ су профилирани и два пута центрифугирани (+4 °C, 10.000 g, 20 min; Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Немачка). Након првог центрифугирања супернатант је одливен и додат је 75% етанол (8 mL), а затим је уследило још једно центрифугирање и

одливање супернатанта. Талог је сушен на $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$ у сушници (Memmert UF55, Немачка) 20 min, да би се отклонила преостала вода и етанол, а затим је хидриран у dH_2O на магнетној мешалици ($+85\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100 rpm, 1h; Velp Scientifica, Италија).

БМ је замрзнута, лиофилизирана (Christ, Alpha 2-4 LD plus, Немачка) и самлевена (IKA, A11 basic, Немачка). Следећи корак је подразумевао хидрирање БМ (однос 0,1 g у 10 mL dH_2O) и сушење на $+121\text{ }^{\circ}\text{C}$ у трајању од 20 min у сушници (Memmert UF55, Немачка). Овај корак је поновљен 3 пута, а након сваког сушења уследило је додавање нове количине dH_2O . Последњи корак је центрифугирање БМ (8.000 rpm, 10 min; Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Немачка), а добијени супернатант представља екстраховане интраполисахариде (ИПСХ).



Слика 10. Шематски приказ припреме екстраката ЕПСХ и ИПСХ

4.9. Карактеризација ЕПСХ и ИПСХ

4.9.1. FTIR анализа

FTIR спектри изолованих ЕПСХ и ИПСХ снимљени су на спектрофотометру Thermo-Nicolet Model 6700 (Thermo Scientific, САД) опремљеном Smart Orbit (Diamond) ATR прибором и софтвером OMNIC 7.3.

4.9.2. Елементална органска микроанализа

Садржај угљеника, водоника, азота и сумпора је одређен коришћењем Vario EL III CHNS/O елементалног анализатора Elementar (Ханау, Немачка). Микроанализи је претходила припрема узорака која је подразумевала сушење на +105 °С до постизања константне масе.

4.9.3. Детерминација садржаја протеина

Садржај протеина одређен је у изолованим ИПСХ код оба соја, по колориметријској методи везивања боје (Bradford, 1976). Метода је заснована на везивању боје за молекул протеина услед електростатичких и хидрофобних интеракција што доводи до померања апсорпционог максимума везане боје, за разлику од слободне невезане боје и промене црвене боје Commassie Brilliant Blue G у плаву. „Јачина“ боје комплекса је пропорционална концентрацији протеина, док се одређивање вршило на основу стандардне праве са протеином познате концентрације, где је као стандард коришћен раствор BSA (*енг. Bovine Serum Albumin*). Како је боја стабилна кратак временски период, читавање апсорбанце је извршено након 5 min на таласној дужини од 595 nm. Концентрација протеина је прочитана са калибрационе криве и одређена у три понављања, а затим је израчуната средња вредност (mg ек. BSA/g с.м.).

4.9.4. Congo red тест

Интеракција Congo red-а са полисахаридима је коришћена за евалуацију конформационих карактеристика ЕПСХ и ИПСХ у складу са методом Liu *и сар.* уз одређене модификације (Jiao *и сар.*, 2021). Укупно 2 mL раствора полисахарида (2 mg/mL) је помешано са истом запремином (2 mL) 91 $\mu\text{mol/L}$ Congo red реагенса (Sigma Aldrich, Merck Group, Немачка). Следећи корак је подразумевао додаток 1 mL раствора NaOH у распону концентрација од 0 до 0,7 mg/mL. Као контрола коришћен је Congo red реагенс (Sigma Aldrich, Merck group, Немачка). Апсорбанца је читавана на спектрофотометру (Multiskan GO Thermo Scientific, Финска) на следећим таласним дужинама: 400, 440, 480, 520, 560 и 600 nm. Направљена је крива зависности таласне дужине максималне апсорпције и концентрације NaOH.

4.9.5. Скенинг електронска микроскопија

Морфолошка анализа је рађена на JEOL JSM 6460 LV (JEOL, Токио, Јапан) скенирајућем електронском микроскопу (SEM) Универзитетског Центра за Електронску Микроскопију у Новом Саду. Узорци егзополисахарида ИТА и СРБ сојева су осушени на два различита начина, ваздушно и путем процеса лиофилизације, а затим директно наношени на носаче са двострано лепљивом угљеничном траком. Уследило је напаривање 90 sec златом у BAL-TEC SCD 005 SPUTTER COATER-у на дистанци од 50 mm од извора који је доведен у стање плазме при 30mA. Фотографије су сачињене при напону убрзања од 20 kV у стању високог вакуума.

4.9.6. NMR анализа

NMR спектри су снимљени на NMR 400 MHz - Varian / Agilent спектрометру коришћењем главе сонде широког опсега од 5 mm. Спектри су добијени на 25 °C у DMSO-d₆ (15 mg/mL) са натријум-2,2-диметил-2-силапентан-5-сулфонатом (DSS) као интерним референтним стандардом. Због слабе растворљивости тестираних узорака у

диметилсулфоксиду (DMSO), одређени узорци су подрвргнути ензимском третману који је претходио NMR анализи. Ензимски третман је подразумевао третирање ДНК-азом, РНК-азом и протеазом, након чега је уследила дијализа и лиофилизација узорака (McLean *и сар.*, 1990).

4.10. Прајминг семена грашка

Припрема семена повртарског грашка укључивала је стерилизацију семена 5% натријум хипохлоритом (NaClO) испирање дестилованом водом три пута. Прајминг семена је изведен потапањем семена грашка у дестиловану воду (хидропрајминг) и водене растворе полисахаридних екстраката гљиве *S. commune* Fr. концентрације 1% (10 mg/mL) (ЕПСХ и ИПСХ) у односу 1:5 (w/v) - биопрајминг (Fargoq *и сар.*, 2006) у трајању од 6 h (Arafa *и сар.*, 2022). Биопрајминг је укључивао потапање у растворе ЕПСХ и ИПСХ оба соја испитиване гљиве – ИТА и СРБ, док је контрола била без прајминга. Након тога, семе је добро испрано дестилованом водом и ваздушно посушено на филтер папиру до приближно почетне масе семена.

4.11. Испитивање квалитета семена и почетног пораста биљака грашка у оптималним условима и условима водног дефицита – суше

Тестирање квалитета семена је изведено у Лабораторији за испитивање семена Института за ратарство и повртарство, Нови Сад применом стандардног теста клијавости (ISTA, 2022).

4.11.1. Детерминација клијавости семена

Радни узорак се састојао од 3 x 100 насумично одабраних семена. Семе након прајминга и контрола су сејани у пластичне кутије димензија 240×150 mm, док је стерилисан песак коришћен као подлога. Оглед се састојао од укупно 36 кутија, груписаних у два сета, где је један сет садржао 18 кутија које су оптимално снабдеване водом, а други је садржао 18 кутија у којима је симулирана суша употребом -0,5 МПа раствора полиетилен гликола (ПЕГ-6000) (Таминдџић *и сар.*, 2021b). Оба сета узорака су инкубирана у комори за наклијавање на температури од 20 °С у трајању од осам дана (ISTA, 2022). Енергија клијања је одређена пети дан након сетве, док је клијавост семена и проценат атипичних изданака детерминисан осмог дана.

4.11.2. Детерминација дужине надземног дела и корена биљке и односа корен/надземни део

У циљу детерминације пораста биљака грашка, 25 семена по понављању су постављена у филтер папир наквашен водом (оптимални услови) и -0,5 МПа раствором ПЕГ (водни дефицит- суша) након чега је уследила инкубација у комори за наклијавање (20 °С, осам дана). Дужина надземног дела и корена 10 типичних изданака одређена је петог и осмог дана употребом лењира (Таминдџић *и сар.*, 2023).

Однос корен/надземни део (ОКН) (*енг. Root/Shoot Ratio*) одређен је осмог дана након постављања семена у филтер папирна основу следеће формуле (Вауат *и сар.*, 2022):

$$\text{Однос корен/надземни део (ОКН)} = \frac{\text{Просечна дужина корена (mm)}}{\text{Просечна дужина надземног дела (mm)}}$$

4.11.3. Детерминација масе свежег и сувог надземног дела и корена биљке

Осмог дана након поставке семена у филтер папир измерена је маса свежег надземног дела и корена на аналитичкој ваги (Kern 770-13, KERN & Sohn GmbH, Balingen, Немачка). Након тога, узорци су сушени у сушници 24 h (Heraeus UT 12 Oven, Heraeus Instruments, Немачка) на температури од 80 °C, након чега је детерминисана маса сувог надземног дела и корена изданака грашка.

4.11.4. Детерминација стопе (брзине) издуживања надземног дела (*енг. Shoot Elongation Rate, SER*) и корена грашка (*енг. Root Elongation Rate, RER*)

Стопа издуживања надземног дела (СИН) (*енг. Shoot Elongation Rate, SER*) и стопа издуживања корена грашка (СИК) (*енг. Root Elongation Rate, RER*) су одређене методом по Chappaoui и сар. (2019) у три понављања употребом следећих формула:

$$SER = \frac{SLE - SLS}{TE - TS}$$

$$RER = \frac{RLE - RLS}{TE - TS}$$

где SLE представља дужину надземног дела, а RLE дужину корена изданака одређену петог дана, SLS, RLS приказују дужину надземног дела и корена изданака одређену осмог дана, док су TE и TS периоди (дани) између два мерења.

4.11.5. Детерминација индекса вигора семена

На основу доле наведене формуле, одређен је индекс вигора (или виталности) семена (СВИ) (*енг. Seedling Vigor Index, SVI*) (Abdul-Baki и Anderson, 1973):

$$SVI = SL \times FG$$

где је SL дужина изданака (енг. *Shoot length*) (cm), а FG представља клијавост семена (енг. *Final germination*) (%).

4.11.6. Тест пропустљивости електролита

Ефекат на пермеабилност мембране је процењен мерењем пропустљивости електролита по методи Blum и Ebercon (1981), описаној од стране Faroog *и сар.* (2008). Шест дискова листа грашка су првобитно испрани дестилованом водом, а затим су потопљени у 6 mL дестиловане воде у трајању од 12 h након чега је измерен електрична проводљивост раствора (C1) употребом лабораторијског кондуктометра (Laboratory Research Grade Benchtop EC/TDS/Salinity/Resistivity Meter — HI5321, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, САД). Узорци су затим загревани у кључалој води у трајању од 20 min, потом су охлађени на собној температури након чега је измерена електрична проводљивост раствора (C2). Пропустљивост електролита (ПЕ) је изражена као однос између C1 и C2.

4.11.7. Детерминација индекса стабилности мембране

Индекс стабилности мембране (ИСМ) (енг. *Membrane stability index*, MSI) је детерминисан према процедури Sairam (1994), описаној од стране Tamindžić *и сар.* (2023). У циљу одређивања овог параметра постављена су два сета епрувета са 0,10 g свежје масе листова и 10 mL дестиловане воде. Један сет епрувета је загреван на 30°C у воденом купатилу (VIMS elektrik, WKP-14, Република Србија) 30 min, након чега је измерена електрична проводљивост (C1) употребом лабораторијског кондуктометра (Laboratory Research Grade Benchtop EC/TDS/Salinity/Resistivity Meter — HI5321, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, САД). Други сет епрувета је загреван у воденом купатилу на 100°C у трајању од 15 min након чега је анализирана електрична проводљивост (C2). ИСМ је израчунат применом наведене формуле:

$$\text{ИСМ} = \left[1 - \frac{C1}{C2}\right] \times 100$$

14.11.8. Детерминација релативног садржаја воде

Релативан садржај воде (PCB) (eng. Relative water content, RWC) у листовима грашка детерминисан је применом процедуре описане у раду *Farooq и сар. (2008)*. За потребе овог теста одмерено је отприлике 0,50 g свежe масе листова (W_f), а затим су листови испрани и уроњени у епрувете напуњене водом до потпуне сатурације, након чега је уследило ново мерење (W_s). Засићени листови су затим сушени у сушници 24 часа (80 °C) и поново је измерена њихова маса (W_d). Релативан садржај воде је затим одређен применом следеће формуле:

$$RWC = \frac{(W_f - W_d)}{(W_s - W_d)} \times 100$$

4.11.9. Детерминација индекса толерантности грашка на стрес, индекса толеранције надземног дела изданака на стрес и индекса толеранције корена на стрес

Индекс толерантности грашка на водни дефицит, односно на стресне услове (суша) (ИТС) прерачунао према Maiti *u cap.* (1994):

$$\text{Индекс толерантности на сушу (ИТС)} = \frac{\text{Маса сувих биљака у контроли (g)}}{\text{Маса сувих биљака у третираној групи (g)}}$$

Индекс толеранције надземног дела изданака на стрес (ИТНС) (*енг. Shoot length stress tolerance index, SLSI*) и индекс толеранције корена на стрес (ИТКС) (*енг. Root length stress tolerance index, RLSI*) су детерминисани применом следећих формула (Shilpa и Lawre., 1985; Ahmed *u cap.*, 2019):

$$\text{ИТНС} = \frac{\text{Просечна дужина надземног дела у третману (мм)}}{\text{Просечна дужина надземног дела у контроли (мм)}}$$

$$\text{ИТКС} = \frac{\text{Просечна дужина корена у третману (мм)}}{\text{Просечна дужина корена у контроли (мм)}}$$

4.12. Припрема биљних екстраката

Екстракти грашка су припремљени из свеже (искључиво надземни делови) и суве масе грашка (одвојено надземни делови и корен). Припремљени су и екстракти контрола, као и екстракти биљака чије јесеме било подвргнуто хидропрајмингу (прајминг са водом) и биопрајмингу полисахаридним екстрактима СРБ и ИТА соја гљиве *S. commune* Fr., у оптималним условима, као и у условима стреса водног дефицита, односно суше. Укупно је припремљено 12 различитих екстраката из свеже масе, као и 24 различита екстракта из суве масе.

4.12.1. Припрема екстраката из свеже масе

Укупно 0,50 g свеже масе листова је одмерено на аналитичкој ваги и измацерирано уз помоћ течног азота и 3 mL екстракционог фосфатног пуфера (pH 7,5). Након тога, екстракти су центрифугирани (Centrifuge 5424 R, Eppendorf, Немачка) (13.000 rpm, 20 min), а супернатант је коришћен за даље анализе.

4.12.2. Припрема екстраката из суве масе

Одвојено су припремљени МЕ екстракти грашка из осушене масе надземних делова и осушене масе корена. Екстракција 1 g надземних делова и 1 g корена биљке у 50 mL 80% метанола трајала је 24 h на тресилици (ИКА, Немачка) на собној температури. Након тога, екстракти су центрифугирани (10.000 g, 4 °C, 20 min; Centrifuge 5424 R, Eppendorf, Немачка) и супернатант је коришћен као екстракт за даље анализе. Финална концентрација екстраката биљке је била 20 mg/mL.

4.13. Детерминација ензимске активности екстраката грашка

За детерминацију ензимске активности коришћени су свежи екстракти добијени из надземних делова биљака грашка, док је за коначно прерачунавање активности испитиваних ензима коришћена концентрација протеина одређена у екстрактима методом по Bradford-у (1976), описаној у Поглављу 4.9.3.

4.13.1. Детерминација активности пирогалол пероксидазе

Активност пирогалол пероксидазе одређена је спектрофотометријском методом заснованој на каталитичкој улози овог ензима у оксидо-редукционој реакцији, при којој долази до оксидације пирогалола који служи као супстрат и редукције водоник пероксида (Nakan и Asada, 1981). У реакциону смешу је додат екстракт (50 μ L), 50 mM калијум-фосфатни пуфер pH вредности 6 (900 μ L), 1M пирогалола (42 μ L) и 1M H₂O₂ (8 μ L). Пораст

апсорбанце је праћен сваких 15 sec током 5 min на 420 nm. Добијене вредности су уврштене у следећу формулу за прерачунавање активности пирогалол пероксидазе (pPX):

$$pPX = \frac{\Delta A \times 4 \times V \times r}{V_{uz} \times \epsilon \times l} \quad (\mu\text{molmin}^{-1}\text{mL}^{-1})$$

где је ΔA средња вредност промене апсорбанце, V запремина реакционе смеше, r фактор разређења и V_{uz} запремина екстракта, док ϵ представља моларни екстинкциони коефицијент ($2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), а l дужину оптичког пута (1 cm).

Активност испитиваног ензима је затим прерачуната на основу концентрације протеина одређене методом по Bradford-у (1976), описаног у Поглављу 4.9.3.:

$$pPX = \frac{\Delta A \mu\text{molmin}^{-1}\text{mL}^{-1}}{\text{mg (протеина)} \text{ mL}^{-1}} \times 1000 \quad (\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1})$$

Резултати су изражени као количина насталог продукта (пурпуругалина) у $\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ протеина.

4.13.2. Детерминација активности гвајакол пероксидазе

Активност гвајакол пероксидазе је одређена методом по Chance-у и Maehly-ју (1955), заснованој на редукцији H_2O_2 помоћу гвајакола као донора електрона који у присуству ензима и водоник пероксида прелази у жути тетрагвајакол. Реакциона смеша је садржавала биљни екстракт, 50 mM калијум-фосфатни пуфер (pH 7), 5mM H_2O_2 и 18 mM гвајакол тако да укупна запремина буде 1 mL. Вредности апсорбанце су читавани сваких 15 sec током 3 min на таласној дужини од 470 nm, како би се пратио пораст. Активност гвајакол пероксидазе (gPX) је представљена као количина насталог тетрагвајакола изражена у $\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ протеина, а израчуната је на основу следећих формула:

$$gPX = \frac{\Delta A \times 4 \times V \times r}{V_{uz} \times \epsilon \times l} \quad (\mu\text{molmin}^{-1}\text{mL}^{-1})$$

$$gPX = \frac{\Delta A \mu\text{molmin}^{-1}\text{mL}^{-1}}{\text{mg (протеина)} \text{ mL}^{-1}} \times 1000 \quad (\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1})$$

где је моларни екстинкциони коефицијент износио $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.13.3. Детерминација активности аскорбат пероксидазе

Активност аскорбат пероксидазе у биљним екстрактима одређена је спектрофотометријски, мерењем апсорбанце на таласној дужини од 290 nm сваких 10 секундаком 3 min (Nakan и Asad, 1981). У реакциону смешу (укупна запремина 1 mL) са екстрактом додате су следеће хемикалије: 50 mM калијум-фосфатни пуфер (pH 7), 12 mM H₂O₂, 10 mM аскорбинска киселина и 10 mM EDTA (етилен диамин тетра сирћетна киселина) и пуфер А (смеша 50 mM калијум-фосфатног пуфера и 10 mM EDTA).

Активност аскорбат пероксидазе (APX) прерачуната је на основу следећих формула ($\epsilon = 2,80\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$):

$$aPX = \frac{\Delta A \times 6 \times V \times r}{V_{uz} \times \epsilon \times l} \quad (\mu\text{molmin}^{-1}\text{mL}^{-1})$$

$$aPX = \frac{\Delta A \mu\text{molmin}^{-1}\text{mL}^{-1}}{\text{mg (протеина)} \text{mL}^{-1}} \times 1000 \quad (\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1})$$

Резултати су изражени у $\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ протеина.

4.13.4. Детерминација активности каталазе

Активност каталазе је одређена спектрофотометријски праћењем пада апсорбанце на таласној дужини од 240 nm на сваких 10 секундаком две min (Аеби, 1984). Непосредно пре мерења у кварцну кивету је додат екстракт (50 μL) и 950 μL реакционе смеше (50 mM калијум-фосфатни пуфер pH 7 и 10 mM H₂O₂).

Активност каталазе (CAT) је одређена на основу следећих формула:

$$CAT = \frac{\Delta A \times 6 \times V \times r}{V_{uz} \times \epsilon \times l} \quad (\mu\text{molmin}^{-1}\text{mL}^{-1})$$

$$CAT = \frac{\Delta A \mu\text{molmin}^{-1}\text{mL}^{-1}}{\text{mg (протеина)} \text{mL}^{-1}} \times 1000 \quad (\text{nmolmin}^{-1}\text{mg}^{-1})$$

где је моларни екстинкциони коефицијент (ϵ) износио $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.14. Детерминација укупног садржаја хлорофила и каротеноида грашка

Укупан садржај хлорофила и каротеноида у листовима грашка је одређен по методи Kamble *и сар.* (2015). Одмерена свежа маса листова (0,1 g) је екстрахована у хладном авану уз додатак кварцног песка, ацетона (80%) и MgCO_3 . Након филтрације измерена је апсорбанца екстраката лишћа наталасној дужини од 662 nm, 644 nm и 440 nm, а као слепа проба је коришћен 80% ацетон.

Садржај пигмената у лишћу је израчунат на основу следећих формула:

$$\text{хлорофил а (Ha)} = 9,784 \times A_{662} - 0,990 \times A_{644} \text{ (mg/mL)}$$

$$\text{хлорофил б (Hb)} = 21,426 \times A_{644} - 4,65 \times A_{662} \text{ (mg/mL)}$$

$$\text{хлорофила + б (Ha + Hb)} = 5,134 \times A_{662} + 20,436 \times A_{644} \text{ (mg/mL)}$$

$$\text{каротеноиди (K)} = 6,695 \times A_{440} - 0,268 \times (\text{хлорофил а+б}) \text{ (mg/mL)}$$

Концентрација пигмената изражена је у mg/g свежег лишћа, применом формуле:

$$C = \frac{C_1 \times V \times r}{m}$$

где C_1 представља масену концентрацију пигмента (mg/L), V запремину филтрата (L), r подразумева разблажење филтрата, док је m маса узорка изражена у грамима (g).

4.15. Детерминација антиоксидативне активности екстракта грашка

4.15.1. Детерминација капацитета „хватања“ DPPH радикала

Капацитет „хватања“ DPPH радикала одређен је у биљним екстрактима добијеним из суве масе грашка (надземни део и корен) у распону концентрација од 20 до 1,25 mg/mL. Детаљна метода је описана у Поглављу 4.3.1.

4.15.2. Детерминација капацитета „хватања“ ABTS радикала

Капацитет „хватања“ ABTS радикала детерминисан је у биљним екстрактима добијеним из суве масе (надземни део и корен) у распону концентрација 20 до 1,25 mg/mL, док је детаљна метода описана у Поглављу 4.3.2.

4.15.3. Детерминација капацитета „хватања“ OH радикала

Метода за одређивање антиоксидативног капацитета хидроксил радикала описана је у Поглављу 4.3.3. Неутрализација OH радикала испитана је у биљним екстрактима добијеним из суве масе грашка (надземни део и корен) за следеће концентрације 20, 10, 5, 2,5 и 1,25 mg/mL.

4.15.4. Инхибиција липидне пероксидације

Инхибиција липидне пероксидације биљних екстракта надземних делова (из суве масе) испитана је помоћу TBA методе (Halliwell и Gutteridge, 1986). Улогу супстрата за липидну пероксидацију, изазвану Fe²⁺ јонима у синергизму са аскорбатом, имале су полинезасићене масне киселине из ланеног уља добијене екстракцијом. Комплетан механизам покретања липидне пероксидације Fe²⁺ јонима није у потпуности познат, али је разјашњено да јони гвожђа могу ући у реакцију са кисеоником из ваздуха и формирати реактивне кисеоничне врсте, попут супероксид анјон радикала који се сматра главним

покретачем липидне пероксидације. Кисеонични радикал са полинезасићеном масном киселином (LH) гради липидни радикал (L•) који затим реагује са кисеоником и гради пероксил радикал (LOO•), који улази у реакцију са следећим молекулом LH градећи нови липидни радикал и липидни хидропероксид (LOOH). LOOH реагује са редукованим металима (Fe^{2+} или Cu^{2+}) и формира алкокси радикал (LO•). LO• и LOO• имају улогу у даљој пропацији ланчане пероксидације, док настали оксидовани метали (Fe^{2+} или Cu^{2+}) се редукују у присуству аскорбинске киселине и у реакцији са LOOH и настају поново слободни пероксил радикали. Присуство аскорбинске киселине и Fe^{2+} може изазвати разградњу LOOH на реактивне алдехидне производе укључујући малондиалдехид (MDA), 4-хидрокси-2-хексенал (4-HNE), 4-хидрокси-2-ноненал (HNE), и акролеин. Финални производ реагује са тиобарбитуратном киселином (ТВА) и при томе формира обојени комплекс.

Радне пробе, корекција и контрола припремљени су у епруветама, додавањем 600 μ L раствора масних киселина, 50 μ L екстракта надземних делова грашка (добијених из све масе), 10 μ L 1,832 mmol/L $FeSO_4$, 10 μ L аскорбата у радне пробе и контроле, док је корекција садржала 620 μ L пуфера (pH 7,4) и 50 μ L екстракта. Након инкубације на 37 °C у трајању од 1 h, додати су 3,72% раствор EDTA (40 μ L) и ТВА реагенс (400 μ L) у све узорке и уследило је загревање (15 min, 100 °C) и центрифугирање (15 min, 3.500 obrt/min). На крају теста, по 250 μ L одговарајућег раствора пребачено је у микротитар плоче и апсорбанца је очитана на таласној дужини од 532 nm. Резултати су изражени као средња вредност три одређене IC_{50} вредности (μ g/mL) \pm СД – концентрација која инхибише липидну пероксидацију за 50%.

4.16. Хемијска карактеризација екстракта грашка

4.16.1. Детерминација садржаја протеина

Садржај протеина одређен је у екстрактима биљке, добијеним из све масе грашка, по колориметријској методи везивања боје (Bradford, 1976) описаној у Поглављу 4.9.3.

Концентрација протеина је очитана са калибрационе криве и одређена за сваки биљни екстракт у три понављања, а затим је израчуната средња вредност (mg ек. BSA/g с.м.).

4.16.2. Детерминација садржаја укупних фенола

Садржај укупних фенола детерминисан је у екстрактима надземног дела и корена грашка који су добијени из суве масе (распон концентрација од 20 до 1,25 mg/mL), док је метода описана у оквиру Поглавља 4.6.5.

4.16.3. Детерминација садржаја флавоноида

Садржај флавоноида у биљним екстрактима добијених из суве масе одређен је помоћу спектрофотометријске методе описане од стране Chang *и сар.* (2002). Метода је базирана на формирању обојеног комплекса (Al-комплекс) услед реакције флавоноида и флавогликозида са јонима метала. Радне пробе су припремљене додавањем 30 μ L екстракта, 90 μ L метанола, 6 μ L 0,75 mol/L AlCl₃, 6 μ L 1 mol/L CH₃COONa и 170 μ L H₂O у микротитар плочу, док је за слепу пробу уместо екстракта додат растварач (80% метанол). Апсорбанца је измерена на таласној дужини од 415 nm након 30 min инкубације, док је кверцетин коришћен као стандардно једињење. Резултати су приказани као средња вредност три мерења \pm СД (mg ек. кверцетина/g с.м.).

4.16.4. Детерминација садржаја пролина

Садржај пролина је одређен из свежих надземних делова биљке (Bates *и сар.*, 1973). 10 mg свеже биљке је измацерирано у течном азоту са 3% сулфосалицилне киселине (1,2 mL). Узорци су центрифугирани (13.000 rpm, 5 min), а 1 mL супернатанта је помешан са једнаком запремином глацијалне сирћетне киселине и реагенса нинхидрина (1,25 g нинхидрина у 30 mL глацијалне сирћетне киселине и 20 mL 6M H₃PO₄). По истеку инкубационог периода (90 °C, 1 h), узорци су охлађени на леду и вортексирани (ИКА, Немачка) са 2 mL толуена.

Апсорбанца је очитана на таласној дужини од 520 nm, а L-пролин (Pro) је коришћен као стандардно једињење. Резултати су изражени као mg ек. Pro/g с.м.

4.16.5. LC-MS/MS анализа

Урађена је LC-MS/MS анализа биљних екстраката надземних делова и корена добијених из суве масе грашка, а детаљна метода описана је раније, у оквиру Поглавља 4.6.6.

4.17. Статистичка обрада података

Све антиоксидативне анализе, одређивање укупних садржаја фенола, флавоноида и протеина, као и испитивање инхибиције ацетилхолинестеразе и антимикуробна анализа рађене су у три понављања. Хемијска детекција свих екстраката рађена је у једном понављању. Резултати антиоксидативних тестова који су приказани као IC₅₀ и IC₂₅ вредности су одређени применом линеарне регресионе анализе RSC-а (*енг. Radical Scavenging Capacity*) у софтверу Origin Pro 2016, верзија 9.3. Подаци који су имали нормалну дистрибуцију су подвргнути униваријантној и мултиваријантној анализи (ANOVA и MANOVA), док је Tukey HSD тест коришћен за утврђивање статистички значајне разлике између испитиваних екстраката на нивоу значајности од 95% ($p < 0.05$). Непараметарски тест (*Friedman* тест) је коришћен за статистичку обраду података који немају нормалну дистрибуцију.

Корелациона анализа између антиоксидативног капацитета екстраката гљиве и укупног садржаја фенола је одрађена применом Пирсонове корелације (*енг. Pearson's product-moment*) за податке који су имали нормалну дистрибуцију, и применом Спирманове корелационе анализе (*енг. Spearman*) за податке који нису нормално дистрибуирани. Наведене статистичке анализе су одрађене у IBM SPSS статистичком софтверу (верзија 22.0 за Windows) и Statistica софтверу (верзија 12.01.), док је топлотна мапа изведена у Microsoft Excel програму (верзија 2016). Урађена је и PCA анализа (*енг. Principal Component Analysis*), коришћењем Past 4 Project софтвера (верзија 1.0.0.0.).

5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА И ДИСКУСИЈА

5.1. Молекуларна идентификација врсте

Молекуларна идентификација изолата гљиве је урађена амплификацијом комплетне секвенце унутрашњег транскрибованог спејсера 1, 5.8 S рибозомалног РНК гена и унутрашњег транскрибованог спејсера 2. Секвенца амплификованог фрагмента ДНК идентификована је на следећи начин:

За узорке означене као 0043 и 0047 секвенце амплифицираног фрагмента ДНК идентификоване су као врсте *S. commune* (100%) према бази података нуклеотида Националног центра за биотехнолошке информације (енг. *National Center for Biotechnology Information* – NCBI):

>0043 СРБ

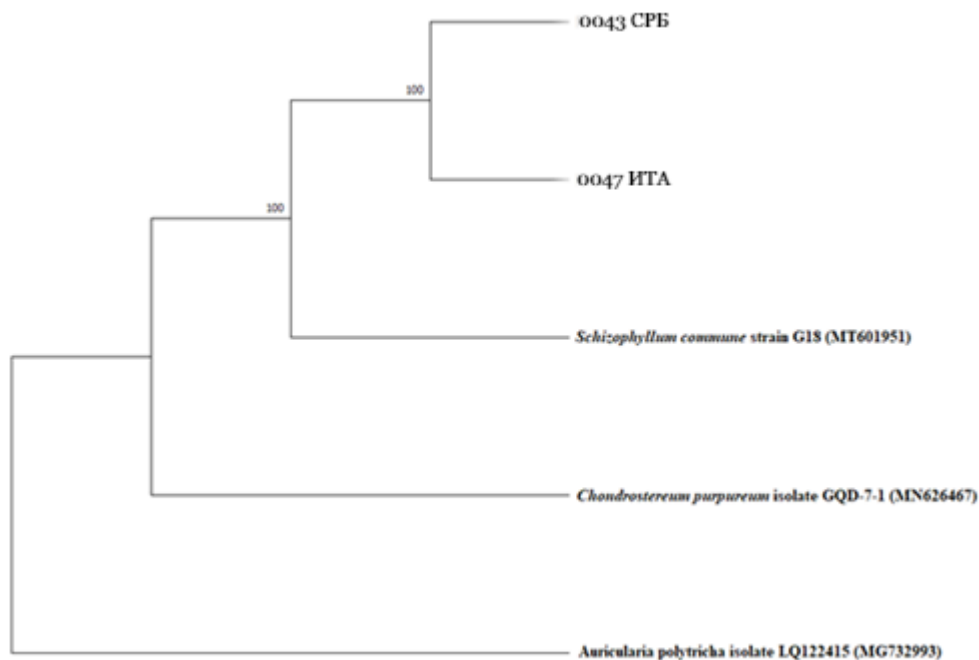
```
TTCTGATCCTGTGCACCTTATGTAGTCCCAAAGCCTTCACGGGCGGCGGTTGA
CTACGTCTACSTCACACCTTAAAGTATGTTAACGAATGTAATCATGGTCTTGACAGACC
СТААААААГТТААТАСААСТТТЦГАСААСГГАТСТТТГГСТСТСГСАТСГАТГААГАА
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT
GAACGCACCTTGCGCCCTTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATТААА
TACCATCAACCCTCTTTTGACTTCGGTCTCGAGAGTGGCTTGGAAGTGGAGGTCTGCT
GGAGCCTAACGGAGCCAGCTCCTCTTAAATGTATTAGCGGATTTCCCTTGCGGGATCG
CGTCTCCGATGTGATAATTTCTACGTCGTTGACCATCTCGGGGCTGACCTAGTCAGTTT
СААТАГГАГТСТГСТТСТААССГТСТТГАССГАГАСТАСГАСТТГТГСГСТААСТ
TTTGACTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC
```

>0047 ИТА

```
CCTGTGCACCTTATGTAGTCCCAAAGCCTTCACGGGCGGCGGTTGACTACGTC
TACSTCACACCTTAAAGTATGTTAACGAATGTAATCATGGTCTTGACAGACCCTАААА
AGTТААТАСААСТТТЦГАСААСГГАТСТТТГГСТСТСГСАТСГАТГААГААСГСАГ
GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACSTTGCGCCCTTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATТАААТАССАТС
AACCCTCTTTTGACTTCGGTCTCGAGAGTGGCTTGGAAGTGGAGGTCTGCTGGAGCC
```

TAACGGAGCCAGCTCCTCTTAAATGTATTAGCGGATTTCCCTTGCGGGATCGCGTCTC
CGATGTGATAATTTCTACGTCGTTGACCATCTCGGGGCTGACCTAGTCAGTTTCAATAG
GAGTCTGCTTCTAACCGTCTCTTGACCGAGACTAGCGACTTGTGCGCTAACTTTTGAC
TTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC

Филогенетско стабло (Слика 11) је конструисано методом спајања суседа, а растојања су израчуната помоћу Кимура двопараметарског модела. Процент реплицираних стабала у којима су повезане таксоне груписане у почетном тесту (1000 понављања) приказан је поред грана. Дрво је нацртано у размери, са дужинама грана у истим јединицама као и оне за еволуционе удаљености које се користе да би се закључило филогенетско стабло. Анализа је укључивала 4 нуклеотидне секвенце. Све позиције са мање од 95% покривености сајта су елиминисане. То јест, мање од 5% празнина у поравнању, недостајућих података и двосмислених база су били дозвољени на било којој позицији.



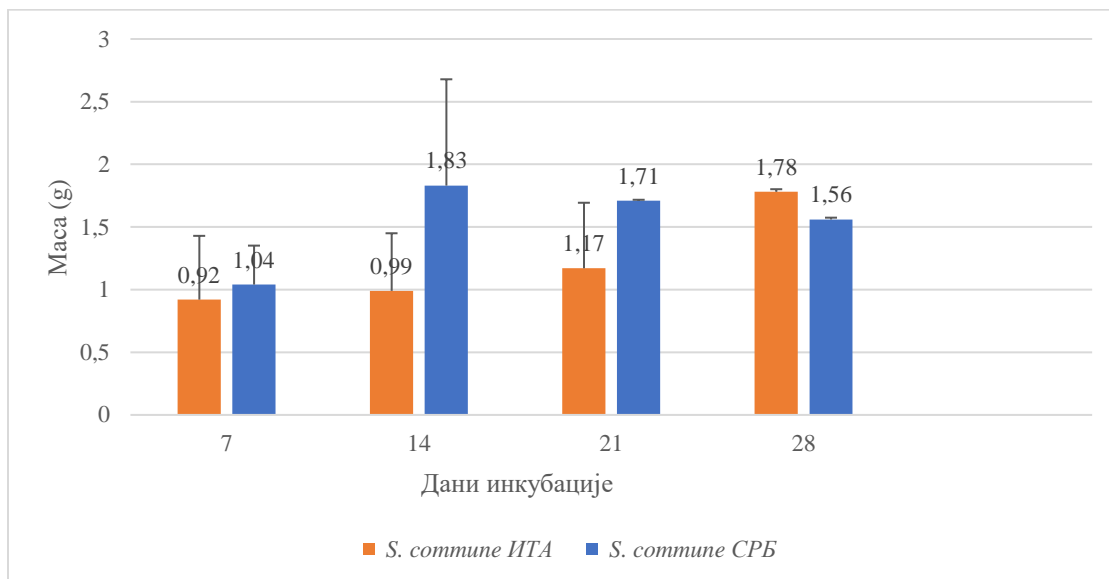
Слика 11. Филогенетско стабло

5.2. Раст гљиве *S. commune* Fr. у потопљеној култури

Засејавању плагова мицелије у потопљену културу претходило је засејавање културе оба соја гљиве на сладни агар и инкубација у трајању од 12 дана, током које је праћен раст гљиве мерењем пречника раста мицелије (Прилог, Табела 8.1. и График 8.1.). Након засејавања мицелије у потопљену културу, током читаве култивације сваких 7 дана је праћен прираст биомасе и филтрата (Прилог, График 8.2.).

Lag фаза код оба соја је трајала три дана, када је примећен спорији раст БМ, као последица привикавања (лаког усвајања постојећих нутријената у подлози) на услове у потопљеној култури. Култура *S. commune* Fr. ИТА се показала потентнијом у односу на СРБ сој, с обзиром да је прираст БМ континуирано растао до краја култивационог периода (28 дан), када је забележен највећи прираст (Хистограм 1). Изолат из СРБ је увећавао БМ у континуитету до 14-ог дана, након чега је забележен пад у прирасту услед „исцрпљености“ културе односно недостатка нутријената.

Принос Ф код ИТА и СРБ соја се значајно разликује, с обзиром да је највећи прираст Ф код ИТА соја забележен након 7 и 14 дана, а код СРБ соја пред крај култивације. Ово указује да је *log* фаза трајала различито код ИТА соја и СРБ соја, односно да је код ИТА соја већ завршена након 14-ог дана. Наиме, *log* фаза представља период раста када је најинтензивније коришћење глукозе као извора угљеника, услед формирања β-глюкана (Sim, 2014). Иако је ИТА сој ушао у стационарну фазу на средини инкубационог периода, раст гљиве је могао да се одржи до краја култивације највероватније захваљујући алтернативном извору угљеника. Наиме, у недостатку примарног извора угљеника гљива *S. commune* Fr. може да користи сопствени производ (шизофилан) захваљујући продукцији β-глюканаза, који деградира β-глюкан (Reyes *u cap.*, 2009), што потврђује и тренд опадања прираста Ф код ИТА соја (Прилог, График 8.2.). Са друге стране, код СРБ соја *log* фаза је трајала дуже, што је утицало да прираст Ф буде највећи пред крај инкубационог периода (Прилог, График 8.2.).



Хистограм 1. Упоредни приказ прираста БМ у потопљеној култури врсте *S. commune* Fr. – ИТА и СРБ сој

5.3. Детерминација антиоксидативне активности гљиве

5.3.1. Антирадикалска активност екстракта гљиве

5.3.1.1. Капацитет „хватања“ DPPH радикала

Капацитет „хватања“ DPPH радикала ПСХ и ЕТ екстракта гљиве одређен је применом стандардног DPPH теста у *in vitro* условима (Espin *u cap.*, 2000), а резултати су приказани у Табели 5. Сви анализирани екстракти су испољили антирадикалску активност код оба соја, а вредност концентрације екстракта неопходне за неутрализацију 50% (IC₅₀) овог радикала варирала су између $14,45 \pm 6,83$ и $377,71 \pm 14,85$ $\mu\text{g/mL}$. Поређењем активности у односу на тип екстракта, јасно је уочљиво да су ПСХ екстракти показали бољу способност неутрализације DPPH радикала, у односу на ЕТ екстракте. Наиме, најјачу антирадикалску активност против DPPH радикала је испољио ПСХ екстракт БМ код ИТА соја, инкубиран 14 дана у потопљеној култури (IC₅₀ = $14,45 \pm 6,83$ $\mu\text{g/mL}$), док је ЕТ екстракт показао 3 пута слабију активност (IC₅₀ = $49,34 \pm 0,65$ $\mu\text{g/mL}$). Међу ПСХ екстрактима,

уочено је да су код оба соја најуспешнију неутрализацију DPPH радикала извршили екстракти Ф инкубирани 7 дана ($IC_{50} = 16,03 \pm 4,30 \mu\text{g/mL}$ за ИТА сој и $IC_{50} = 15,76 \pm 0,63 \mu\text{g/mL}$ за СРБ сој).

Са друге стране, активност БМ ПСХ екстраката разликовала се у односу на период инкубације, с обзиром да је ИТА сој испољио најјачу активност након 14 дана, а СРБ сој након 7 дана инкубационог периода (Табела 5). Код ЕТ екстраката, активност Ф је расла линеарно од 7-ог до 21-ог дана, када је достигла најјачу активност ($IC_{50} = 55,43 \pm 1,89 \mu\text{g/mL}$ код ИТА соја и $IC_{50} = 55,96 \pm 1,31 \mu\text{g/mL}$ код СРБ соја), а затим је почела да опада након 28-ог дана инкубације. Антирадикалска активност ЕТ екстраката БМ је показала веће варијације, али је установљено да је најдоминантнија активност код оба соја забележена након 14 дана инкубације у потопљеној култури (Табела 5). Поред тога применом ANOVA и Friedman-овог теста утврђено је да постоји статистички значајна разлика између ПСХ и ЕТ узорака код СРБ соја, са нивоом значајности $p < 0,05$.

5.3.1.2. Капацитет „хватања“ ABTS радикала

Резултати процене реактивности испитиваних екстраката са ABTS радикалом, добијени су применом модификоване методе Агпао *и сар.* (2001) и мерењем апсорбанце на таласној дужини од 734 nm, а изражени су у mg екв. тролокса/g с.м. Упоредни преглед способности ПСХ и ЕТ екстраката две културе врсте *S. commune* Fr. да делују против DPPH и ABTS радикала је приказан у Табели 5, где се јасно може приметити да су сви екстракти показали способност капацитета „хватања“ ABTS радикала, са малим варирањем између вредности (од $1,63 \pm 1,71$ до $8,20 \pm 0,94$ mg екв. тролокса/g с.м.). Штавише, способност „хватања“ ABTS радикала је била јача код узорака БМ у поређењу са Ф код оба испитивана соја. Такође, на основу резултата ABTS теста може се закључити да су екстракти Ф ИТА соја показали већу способност неутрализације овог радикала, док је слабија неутрализација одређена у екстрактима БМ овог соја, у односу на екстракте СРБ соја. Међутим, статистичком анализом утврђено је да не постоји статистички значајна разлика између активности испитаних екстраката (ANOVA и Friedman-ов тест, $p < 0,05$).

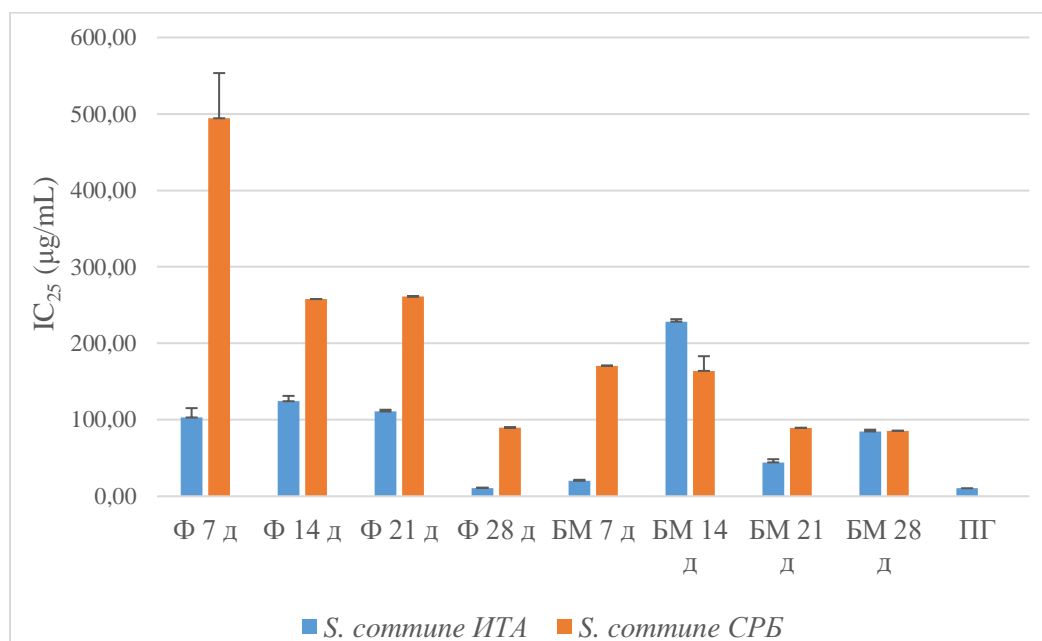
Табела 5. Упоредни приказ капацитета „хватања“ DPPH и ABTS радикала полисахаридних (ПСХ) и етанолних (ЕТ) екстраката врсте *S. commune* Fr.

Екстракти	Период инкубације	DPPH (IC ₅₀) (µg/mL)		ABTS (mg тролокса/g с.м.)	
		ПСХ	ЕТ	ПСХ	ЕТ
<i>S. commune</i> Fr. ИТА					
Ф	7 д	16,03 ± 4,30 ^a	72,65 ± 9,15 ^a	6,64 ± 0,66 ^a	5,17 ± 0,03 ^a
	14 д	107,94 ± 2,36 ^a	63,67 ± 2,65 ^a	8,20 ± 0,94 ^a	4,95 ± 0,41 ^a
	21 д	74,76 ± 19,70 ^a	55,43 ± 1,89 ^a	5,69 ± 0,52 ^a	5,27 ± 0,22 ^a
	28 д	189,81 ± 7,96 ^a	69,15 ± 3,98 ^a	2,86 ± 1,30 ^a	3,38 ± 0,06 ^a
БМ	7 д	94,89 ± 8,41 ^a	82,69 ± 1,93 ^a	5,16 ± 1,63 ^a	5,29 ± 0,05 ^a
	14 д	14,45 ± 6,83 ^a	49,34 ± 0,65 ^a	1,63 ± 1,71 ^a	5,20 ± 0,08 ^a
	21 д	85,39 ± 1,61 ^a	120,63 ± 3,29 ^a	7,49 ± 0,67 ^a	5,84 ± 0,06 ^a
	28 д	93,48 ± 0,01 ^a	105,39 ± 1,66 ^a	5,12 ± 0,39 ^a	4,85 ± 0,19 ^a
<i>S. commune</i> Fr. СРБ					
Ф	7 д	15,76 ± 0,63 ^a	70,86 ± 2,52 ^b	3,80 ± 0,08 ^a	0,28 ± 0,09 ^a
	14 д	32,42 ± 3,09 ^a	53,61 ± 2,32 ^b	3,26 ± 0,96 ^a	9,69 ± 3,67 ^a
	21 д	30,18 ± 2,25 ^a	55,96 ± 1,31 ^b	4,65 ± 0,31 ^a	57,10 ± 2,35 ^a
	28 д	69,69 ± 3,93 ^a	67,31 ± 1,03 ^b	3,40 ± 0,09 ^a	4,36 ± 1,36 ^a
БМ	7 д	18,9 2 ± 6,12 ^a	377,71 ± 14,85 ^b	6,01 ± 0,07 ^a	20,89 ± 1,67 ^a
	14 д	71,55 ± 3,43 ^a	74,6 5 ± 1,74 ^b	3,02 ± 0,10 ^a	9,55 ± 0,51 ^a
	21 д	69,13 ± 4,24 ^a	164,28 ± 2,52 ^b	5,43 ± 0,53 ^a	5,61 ± 1,83 ^a
	28 д	51,41 ± 11,27 ^a	137,5 ± 5,87 ^b	5,49 ± 0,23 ^a	0,90 ± 1,91 ^a

Резултати су представљени као средња вредност три понављања ± стандардна девијација. ^{a,b} У свакој колони различити суперскрипт указује на статистичку значајност (p < 0,05, Tukey's HSD, ANOVA, LSD и Friedman тест).

5.3.1.3. Капацитет „хватања“ OH^\bullet радикала

Капацитет „хватања“ хидроксил радикала одређен је за ЕТ екстракте применом *in vitro* теста описаног од стране Halliwell *и сар.* (1987). Резултати су изражени као IC_{25} вредност ($\mu\text{g/mL}$), односно концентрација екстракта која инхибише 25% слободног радикала, и сликовито представљени на Хистрограму 2, где се јасно може видети да је ИТА сој био потентнији у неутрализацији овог радикала. Екстракти инкубирани 28 дана у потопљеној култури, код оба соја су показали већи степен неутрализације OH^\bullet радикала ($\text{IC}_{25} = 10,80 \pm 0,54 \mu\text{g/mL}$ Ф ИТА; $\text{IC}_{25} = 89,69 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ Ф СРБ, $\text{IC}_{25} = 85,57 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ БМ СРБ, са изузетком екстракта биомасе код ИТА соја који је показао најјачу активност након 7 дана инкубације ($\text{IC}_{25} = 20,20 \pm 1,36 \mu\text{g/mL}$).

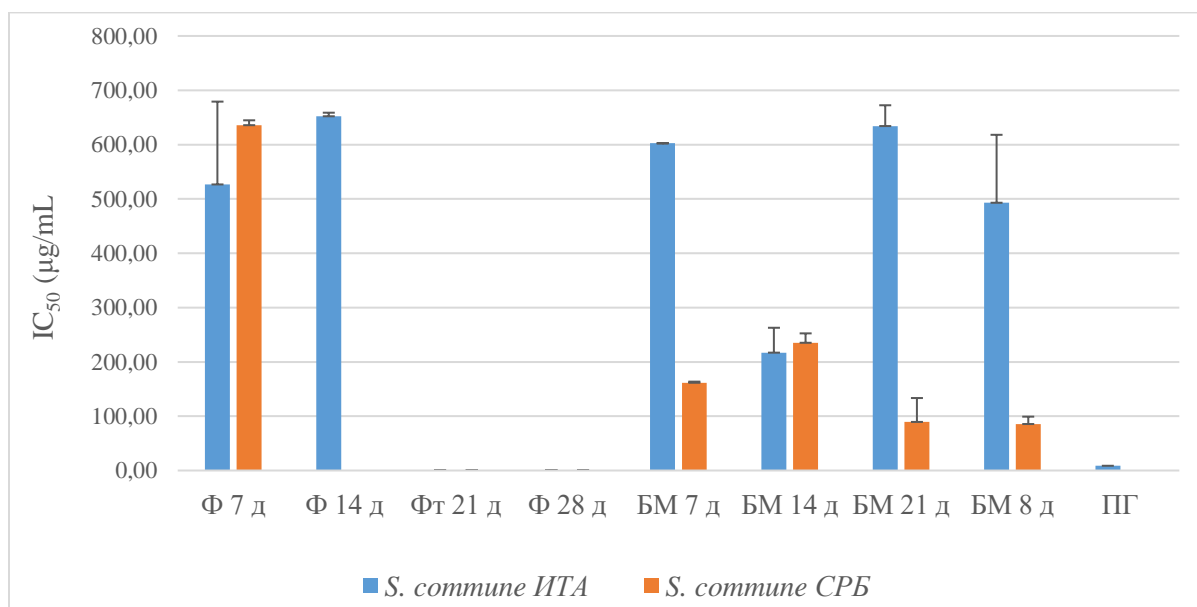


Хистограм 2. Графички приказ антирадикалске активности ЕТ екстракта врсте *S. commune* Fr. на OH^\bullet радикал

5.3.1.4. Капацитет „хватања“ O_2^\bullet радикала

Ниво неутрализације O_2^\bullet радикала ЕТ екстракта гљиве *S. commune* Fr. насталог у реакцији редукције нитро-блутетразолијума (NBT), одређен је применом методе описане од

стране Nishikimi-ја (1972). Сви анализирани ЕТ екстракти су показали антирадикалску активност, док је упоредни приказ одређених IC_{50} вредности ($\mu\text{g/mL}$) код оба соја представљен на Хистограму 3. Концентрације активности одређених екстраката пореклом из Φ нису могле бити приказане преко IC_{50} вредности, с обзиром да су испољили степен неутрализације већи од 90% (екстракти 21 и 28 дана код ИТА соја и 14, 21 и 28 дана код СРБ соја). То даље имплицира да су се екстракти Φ показали као потентнији антиоксиданси против $O_2^{\cdot-}$ радикала, у односу на БМ код оба испитивана соја. Додатно, на основу Хистограма 3, може се закључити да је већи степен неутрализације присутан код екстраката СРБ културе у односу на ИТА културу.

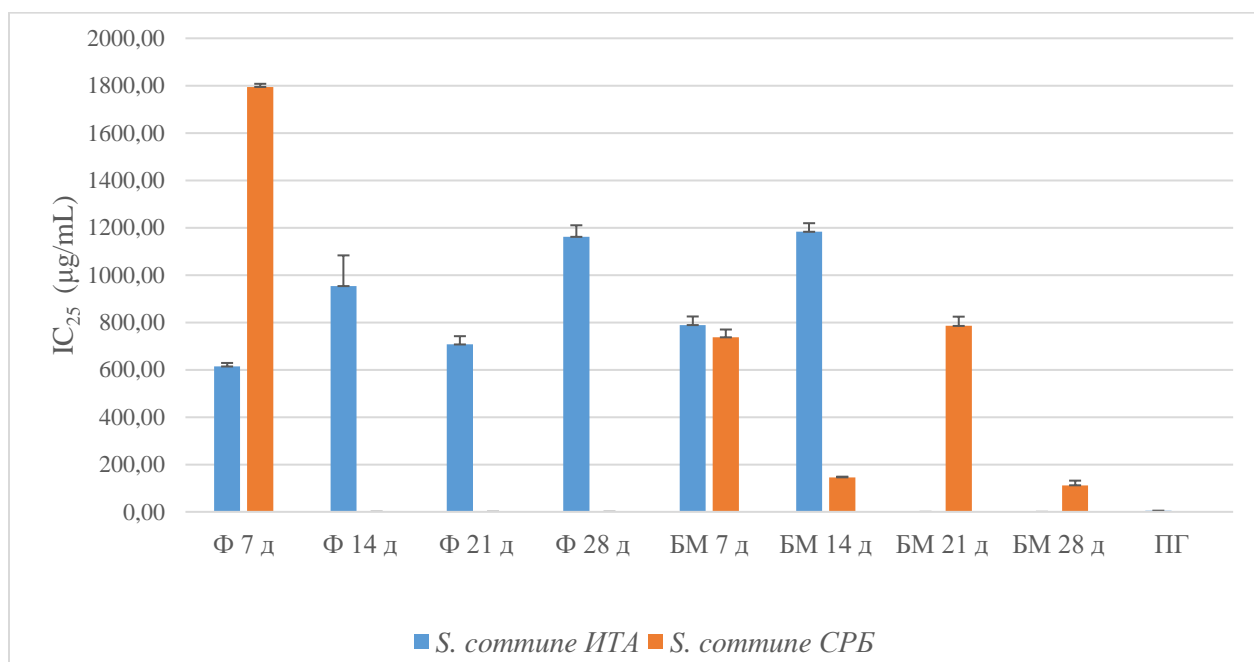


Хистограм 3. Графички приказ антирадикалске активности ЕТ екстраката врсте *S. commune* Fr. против $O_2^{\cdot-}$ радикала

5.3.1.5. Капацитет „хватања“ NO^{\cdot} радикала

Степен неутрализације NO^{\cdot} радикала приликом које долази до формирања пурпурно-ружичастог диазо комплекса чија се апсорбанца мери на таласној дужини од 546 nm, одређен је применом спектрофотометријске методе (Green *и сар.*, 1982). Резултати неутрализације нитритних јона приказани су на Хистограму 4. Анализа резултата је

показала да су екстракти оба соја гљиве имали слабију активност неутрализације нитритних јона, у поређењу са неутрализацијом осталих испитиваних слободних радикала. Такође, екстракти БМ код ИТА соја инкубирани 21 и 28 дана нису били активни, док екстракти Ф код СРБ соја нису ни достигли IC_{25} вредност, са изузетком екстракта који је 7 дана био у потопљеној култури.

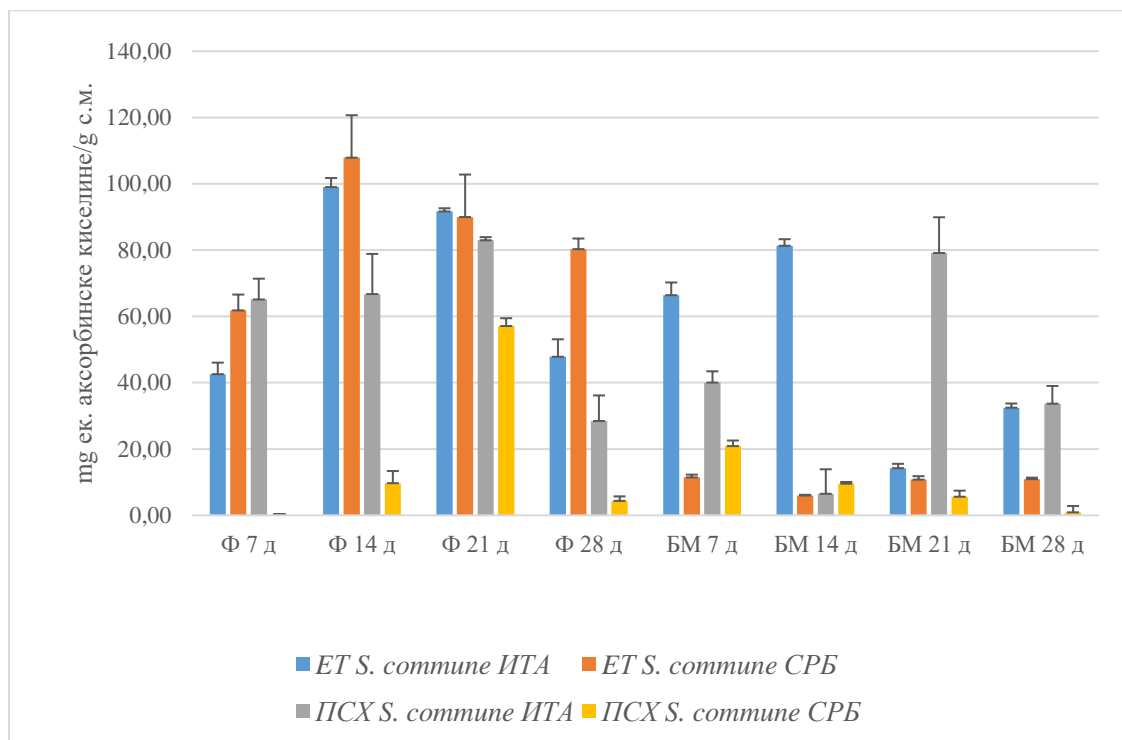


Хистограм 4. Графички приказ антирадикалске активности ЕТ екстраката врсте *S. commune* Fr. против $NO\bullet$ радикала

5.3.2. Редукциони потенцијал екстраката гљиве

Редукциони потенцијал ПСХ и ЕТ екстраката гљиве анализиран је применом FRAP есеја и приказани су на Хистограму 5. Анализа редукције јона Fe је показала већу ефикасност ИТА соја, са изузетком ЕТ екстракта Ф, пореклом из Србије (14 дана инкубација) који је испољио најјачу активност ($107,86 \pm 12,81$ mg ек. аскорбинске киселине/g с.м.). Поређењем редукционог потенцијала Ф и БМ може се уочити да су већи потенцијал показали екстракти Ф. Додатно, поређењем редукционог потенцијала у односу на тип екстракта, јасно се види да су ПСХ екстракти Ф слабији у односу на ЕТ екстракте,

док је код екстраката БМ обрнут случај (Хистограм 5). Када је у питању утицај дужине инкубационог периода на редукцију јона Fe, статистичка анализа (ANOVA, $p < 0,05$) је показала да дужина инкубације није имала утицај на повећање редукционог потенцијала.



Хистограм 5. Упоредни приказ редукционог потенцијала (FRAP метода) етанолних и полисахаридних екстраката СРБ и ИТА соја врсте *S. commune* Fr.

Антиоксидативна активност ПСХ и ЕТ екстраката врсте *S. commune* Fr. је процењена коришћењем стандардних *in vitro* есеја. У поређењу са ЕТ екстрактом са најјачом анти-DPPH активношћу ($IC_{50} = 49,34 \pm 0,65 \mu\text{g/mL}$), ЕТ и МЕ екстракти *S. commune* Fr. из Малезије су показали три пута нижу активност ($IC_{50} = 153,1 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$) (Abdullah *u cap.*, 2012), док је ЕТ екстракт исте врсте пореклом из Индије, показао два пута већу неутрализацију овог радикала ($IC_{50} = 18,56 \mu\text{g/mL}$) (Chandrawanshi *u cap.*, 2017). Поред тога, Tripathy и Tiwary (2013) су показали јачу неутрализацију DPPH радикала од стране екстракта мицелије инкубиране 10 дана у потопљеној култури ($IC_{50} = 31,40 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$). Потопљени екстракти *S. commune* Fr. са Тајланда су испољили нешто јачу активност против поменутог радикала, с обзиром да је инхибиција варирала од 34,29 до 81,00 %, али је

забележена и дупло јача активност ферментационог медијума (Jiamworanunkul, 2019), што је у складу са резултатима ове докторске дисертације.

Неутрализација ОН радикала од стране ЕТ екстраката БМ је била боља у односу на активност Ф код оба соја (Хистограм 2), са изузетком екстракта Ф ИТА инкубираног 28 дана ($IC_{25} = 10,80 \pm 0,54 \mu\text{g/mL}$), који је показао осам пута јачу антирадикалску активност у поређењу са СРБ екстрактима са истим инкубационим периодом (Ф, $IC_{25} = 89,69 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ и БМ, $IC_{25} = 85,57 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$). Са друге стране, неутрализација NO^{\bullet} и $O_2^{\bullet-}$ радикала је била значајно нижа за све испитиване ЕТ екстракте код оба соја (Хистограм 4 и 3).

С обзиром да постоји статистички значајна разлика у неутрализацији DPPH радикала и редукционом потенцијалу између ПСХ и ЕТ узорака код СРБ соја (Табела бр.2 и Прилог, Табела 8.2.1.) може се закључити да управо тип растварача и начин екстракције имају директан утицај на јачину испитиваних активности, што потврђују и претходне студије. Наиме, Al Azad и Ping (2022) су поредили антирадикалску активност екстраката гљиве *S. commune* Fr. растворених у води и различитим органским растварачима и показали да најјачу анти-DPPH активност имају водени екстракти *S. commune* Fr. ($IC_{50} = 1,52 \text{ mg/mL}$), док је највећи редукциони потенцијал испољио ацетонски екстракт ($IC_{50} = 0,22 \text{ mg/mL}$) (Al Azad и Ping, 2022). Abd Razak *u cap.* (2020) су показали да екстракција хладном водом је утицала на повећану неутрализацију SOA и DPPH радикала од стране ове гљиве, у односу на екстракцију топлом водом. Са друге стране, Chen *u cap.* (2020) су утврдили да је ултразвучна екстракција топлом водом најбоља техника за испитивање антирадикалске активности и редукционог потенцијала, с обзиром да су управо ти екстракти показали највећу антиоксидативну активност.

5.4. Детерминација антимицробне активности гљиве

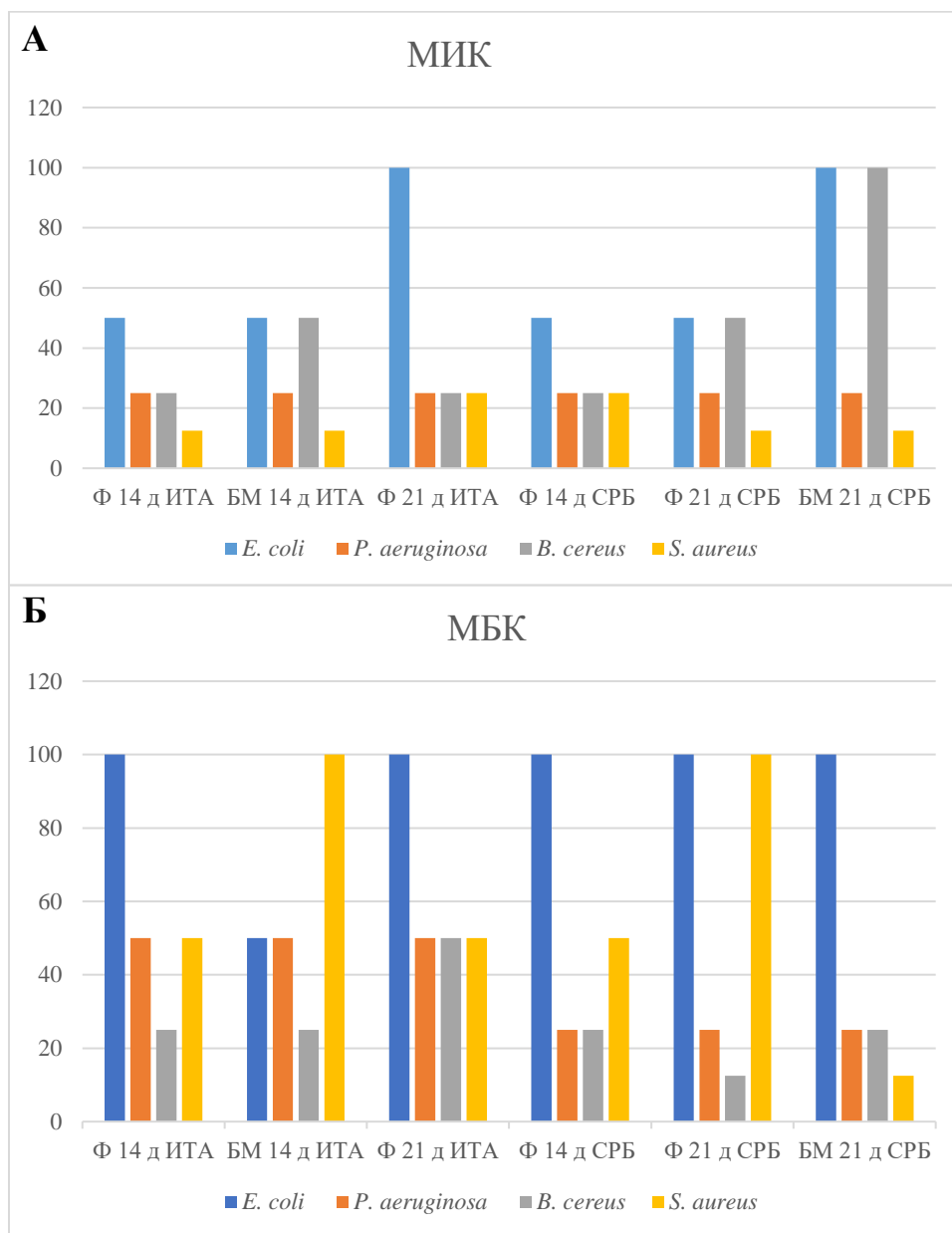
5.4.1. Детерминација антибактеријске активности екстраката гљиве

Анализа антибактеријске активности одабраних ЕТ и МЕ екстраката врсте *S. commune* Fr. из потопљене културе урађена је на две Грам позитивне (*Staphylococcus aureus*

и *Bacillus cereus*) и две Грам негативне бактерије (*Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*). Активност ЕТ екстракта анализирана је у распону концентрација од 50 до 3,1 mg/mL, док се распон концентрација МЕ екстракта кретао од 100 до 6,25 mg/mL. Поред тога, урађен је и антибиограм следећих антибиотика: канамицин, хлорамфеникол, ампицилин и стрептомицин (0,5 - 0,03 mg/mL).

Резултати су показали да су само два ЕТ екстракта СРБ соја била ефикасна у борби против анализираних бактеријских сојева, и то екстракти Ф, инкубирани 14, односно 21 дан. ЕТ екстракт Ф инкубиран 14 дана у потопљеној култури био је активан само против *E. coli*, док је инкубација од 21 дан произвела јачи екстракт, који је показао највећу антибактеријску активност против *E. coli*, *S. aureus* и *B. cereus*, (МИК и МБК < 3,1 mg/mL), али је био слабији против *P. aeruginosa* (МИК и МБК = 50 mg/mL).

Са друге стране, сви испитивани МЕ екстракти су показали антибактеријску активност, посебно против испитиваних Грам позитивних сојева. Битно је напоменути да је најјачу антибактеријску активност међу МЕ екстрактима такође испољио СРБ екстракт Ф инкубиран 21 дан, и то против *B. cereus* (МИК и МБК = 12,5 mg/mL). Међу испитиваним узорцима ИТА соја, издвојили су се екстракти Ф и БМ инкубирани 14 дана као најактивнији (Хистограм 6).



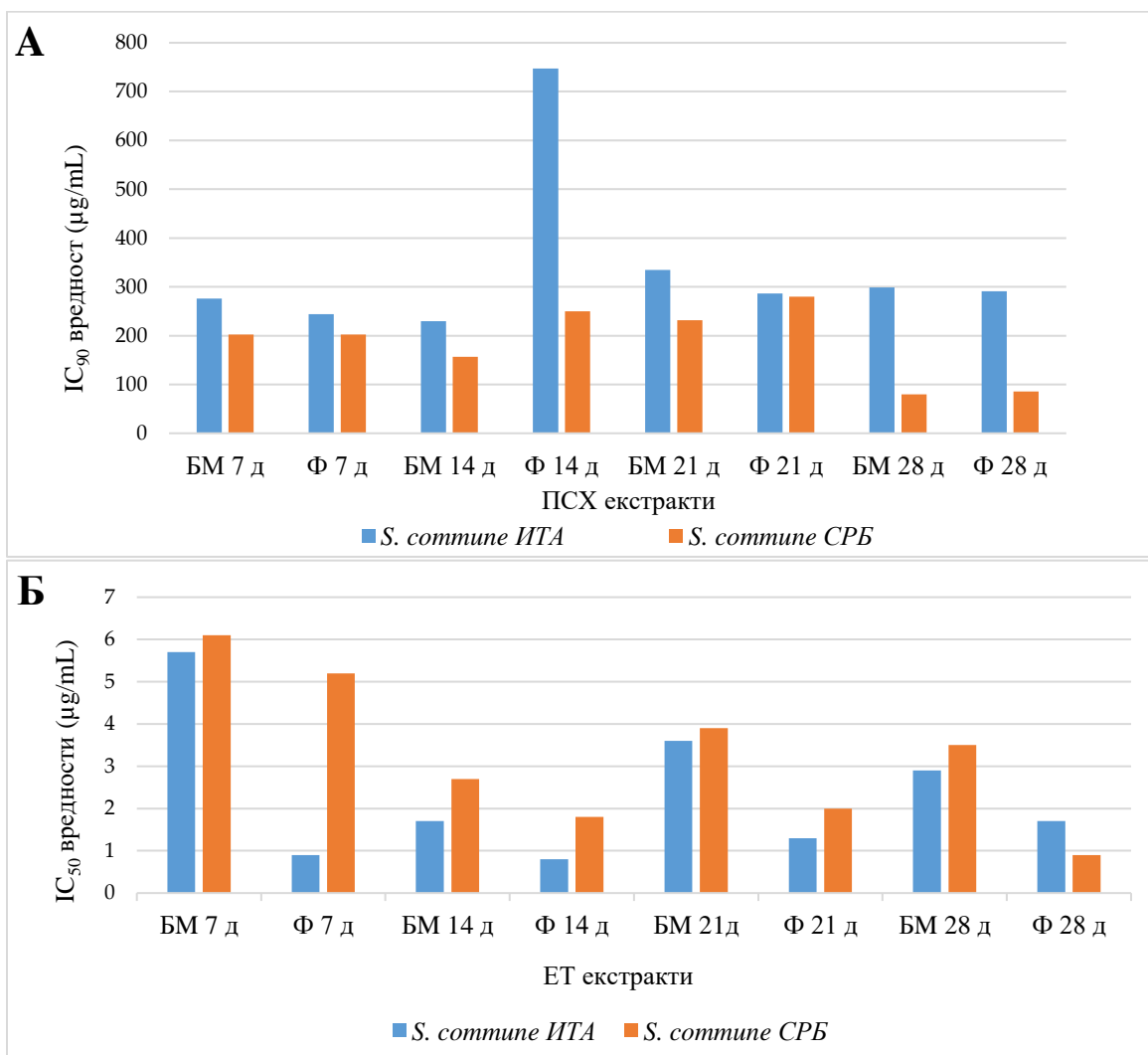
Хистограм 6. МИК (А) и МБК (Б) тестираних узорака гљиве *S. commune* Fr.

Резултати антибиограма су указали на резистенцију *P. aeruginosa* на хлорамфеникол, ампицилин и стрептомицин, као и резистенцију *E. coli* на хлорамфеникол (Прилог 8.3., Табела 8.20.). Као најефикаснији антибиотик на *B. cereus* показао се стрептомицин, с обзиром да су се вредности и МИК/МБК-а у подударности са најнижом испитиваном концентрацијом (0,03 mg/mL).

5.5. Детерминација анти-ацетилхолинестеразне активности гљиве

Инхибиторна активност ензима ацетилхолинестеразе ПСХ и ЕТ екстраката лигниколне врсте *S. commune* Fr. утврђена је у *in vitro* условима применом Ellman-овог теста. Као позитивна контрола је коришћен донепезил ($IC_{50} = 87,32\%$), док су резултати изражени као IC_{50} (ЕТ екстракти) и IC_{90} вредности (ПСХ екстракти), где мања бројчана вредност указује на јачу инхибицију (Прилог 8.4., Табела 8.21.). Важно је напоменути да су резултати за ПСХ екстракте из потопљене културе, добијени у оквиру ове докторске дисертације, пионирски подаци када је у питању испитивање анти-ацетилхолинестеразне активности код врсте *S. commune* Fr. (Мишковић *и сар.*, 2021).

Највећи потенцијал инхибиције поменутог ензима су показали ПСХ екстракти, где највећи опсег испитиваних концентрација (1%) је надмашио IC_{90} (Хистограм 7, А). Са друге стране, различити сојеви испитиване врсте гљиве су показали различиту активност код различитих типова екстраката (Хистограм 7, А и Б). Наиме, СРБ сој је испољио већу инхибицију код ПСХ екстраката, док је ИТА сој био јачи од СРБ соја код ЕТ екстраката. Међу ПСХ екстрактима најјачу анти-ацетилхолинестеразну активност испољио је екстракт БМ СРБ соја инкубиран 28 дана ($IC_{90} = 79,73 \pm 26,34 \mu\text{g/mL}$), чија је активност упоредива са активношћу донепезила, комерцијално одобреног лека за Алцхајмерову болест ($IC_{90} = 87,92 \mu\text{g/mL}$). Међу ЕТ екстрактима, најјачу активност је испољио екстракт Ф ИТА соја инкубиран 14 дана ($IC_{50} = 0,8 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$).



Хистограм 7. Графички приказ анти-ацетилхолинестеразне активности ПСХ (А) и ЕТ екстраката (Б) СРБ и ИТА соја врсте *S. commune*Fr.

Упоређивањем инхибиторне активности БМ и Ф, уочена је већа инхибиторна активност код Ф у оквиру ЕТ екстраката, за разлику од ПСХ екстраката где је обрнута ситуација. Додатно, међу ЕТ екстрактима, разлике у активности биле су везане за период инкубације, а најјача активност је показана након 14 дана инкубације, осим Ф екстракта пореклом из СРБ, који је показао најјачу активност после 28 дана инкубације ($p < 0,05$). Позитиван утицај дужине инкубационог периода на поменути активност се може објаснити највећом производњом секундарних метаболита у каснијим ферментационим периодима раста гљиве у потопљеним културама, укључујући феноле, у потопљеној култури почетком

стационарне фазе када су хранљиве компоненте ограничене односно када култура гљиве изналази начин за преживљавање покретањем других метаболичких путева секундарног метаболизма. Са друге стране, ПСХ екстракти нису показали статистички значајну разлику (ANOVA, $p < 0,05$) у инхибицији ацетилхолинестеразе када је у питању инкубациони период, што доводи до закључка да су и примарни метаболити одиграли битну улогу у инхибиторној активности. Наиме, шизофилан (β -глюкан) је потентни полисахарид испитиване гљиве који је највероватније заслужан за јаку инхибиторну активност ПСХ екстраката. Ово потврђује и чињеница да су Abdullah *u cap.* (2012) забележили слабу инхибицију ацетилхолинестеразног ензима од стране водених екстраката врсте *S. commune* Fr. ($IC_{50} = 0,320 \pm 0,070$ mg/mL), где је фокус истраживања био на фенолним једињењима, а не на примарним метаболитима као што су ПСХ.

На основу анализираних анти-ацетилхолинестеразне активности, може се закључити и да различите географске локације, односно порекло соја (Италија и Србија) са којих су прикупљени испитивани изолати гљиве, могу утицати на активност и производњу различитих метаболита, услед различитих фактора средине који доприносе биохемијским обрасцима специфичног генотипа (соја) (Mišković *u cap.*, 2021; Karaman *u cap.*, 2022).

5.6. Хемијска карактеризација гљиве

5.6.1. FTIR анализа

5.6.1.1. Етанолни екстракти

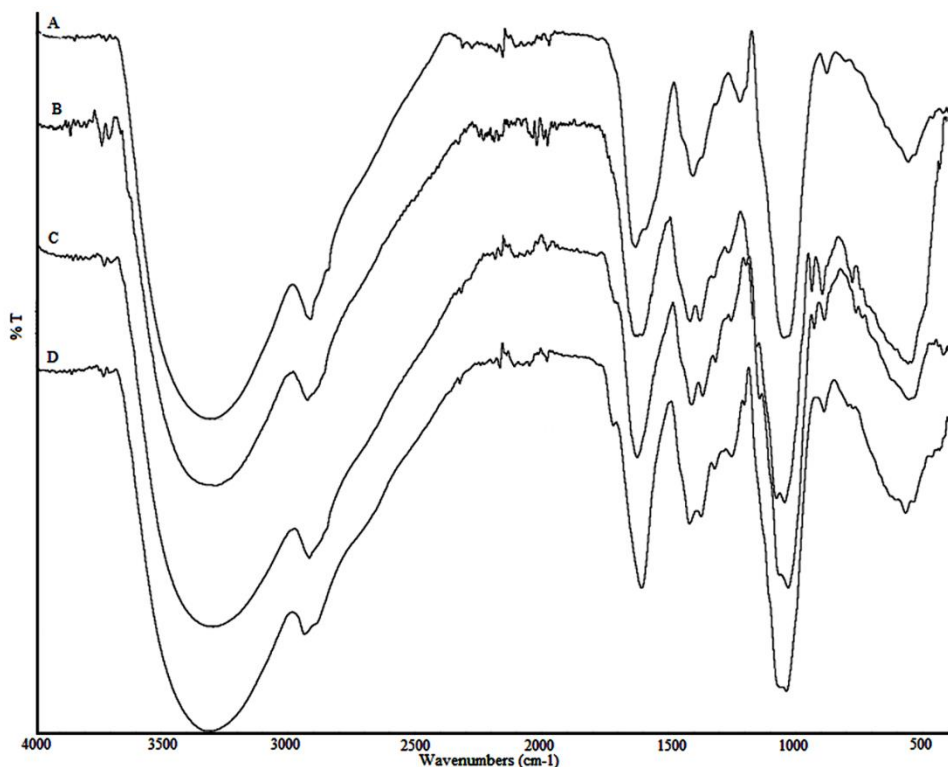
FTIR спектар ЕТ екстракта ИТА соја (Прилог 8.5., *Слика 8.1.*) изолованог из БМ *S. commune* Fr. садржи широку јаку траку у региону $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ која је карактеристична за вибрације истезања О-Н групе као и валенционе вибрације N-H веза присутних у протеинима (Mathlouthi и Koenig, 1986; Carey 1992). Апсорпције у региону $2920 - 2950 \text{ cm}^{-1}$ релевантне су за вибрације истезања C-H група. Трака на 1036 cm^{-1} односи се на валенционе вибрације C-O и C-C, док се апсорпција на 1146 cm^{-1} односи на вибрације истезања C-O-C везе (регион $1160 - 1130 \text{ cm}^{-1}$). Карактеристичне апсорпције на 1624 cm^{-1} и 1404 cm^{-1} односе се на вибрације истезања амидне траке I и II. Траке у региону $1410 - 1310 \text{ cm}^{-1}$ корелирају са валенционим вибрацијама ОН група фенолних једињења. Апсорпција на 1624 cm^{-1} (област $1650 \text{ cm}^{-1} - 1600 \text{ cm}^{-1}$) такође је индикативна и за присуство ароматичних C=C веза које су повезане са C=O (MacCarthy и Rice, 1985.). Спектар изолован из Ф ЕТ екстракта *S. commune* Fr. ИТА (Прилог 8.5., *Слика 8.1.*) је задржао исте структурне специфичности карактеристичне за присуство доминантних угљенохидратних полимера, као и мање количине протеина и полифенолних једињења. У FTIR спектрима ЕТ екстракта изолованих из БМ и Ф код СРБ соја (Прилог 8.5., *Слика 8.2.*) може се уочити да је код узорка Ф промењен интензитет појединих апсорпционих трака. Наиме, интензитет трака у региону $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ који се односи на валенционе вибрације C-O и C-C структура је смањен у односу на интензитета других апсорпционих пикова, што индицира смањење удела угљенохидратних полимера у ондосу на друга једињења која су заступљена у испитиваној смеси. Одсуство карактеристичне етарске траке у региону $1730 - 1740 \text{ cm}^{-1}$ у свим анализираним FTIR спектрима указује на чињеницу да испитивани ЕТ екстракти не садрже уронске киселине као део својих структурних карактеристика.

5.6.1.2. Полисахаридни екстракти

FTIR спектри ПСХ екстраката изолованих из *S. commune* Fr. приказани су на Слици 12. Генерално гледано, спектри имају сличан образац и поклапају се са литературним подацима шизофилана изолованог из ове врсте (Klaus *u cap.*, 2011; Mousaviasl *u cap.*, 2018). Спектри свих испитиваних узорака полисахарида (Слика 12) показали су пикове карактеристичне за присуство претежно молекула полисахарида, мале количине протеина и неких ароматика. Широка истакнута апсорпциона трака са центром око 3300 cm^{-1} у региону $3000 - 3500\text{ cm}^{-1}$ одговарала је затезним вибрацијама О-Н групе структура угљених хидрата повезаних са интер- и интрамолекуларним водоничним везама О-Н група, као и за асиметрично и симетрично истезање N-H везе присутне у аминок групама (Carey, 1992; Kozarski *u cap.*, 2011). Оштар врх у региону $2930\text{ cm}^{-1} - 2920\text{ cm}^{-1}$ одговара асиметричним вибрацијама C-H истезања, као и метиленској групи алифатичке секвенце. Спектри узорака В и D садржали су додатну слабу траку на 2850 cm^{-1} што је индикативно за алифатичне C-H истезне вибрације (Kozarski *u cap.*, 2011). Врхови у региону $1200-1000\text{ cm}^{-1}$ били су повезани са вибрацијама прстена које се преклапају са вибрацијама истезања (C-OH) бочних група и (C-O-C) вибрацијом гликозидне везе угљених хидрата (Kačuráková *u cap.*, 2000). Међу њима, у свим узорцима интензивна оштра апсорпција на $1078 - 1080\text{ cm}^{-1}$ била је карактеристична за присуство β -глюкана због О-супституисаних остатака глукозе (Malthouthi и Koenig, 1987; Stone и Clarke, 1992). Снажна апсорпција на око 1050 cm^{-1} у сваком узорку указује на то да ови полисахариди имају пиранозне прстенове (Thirugnanasambandham *u cap.*, 2015; Yan *u cap.*, 2019). Интензивна апсорпциона трака са максимумом на 1640 cm^{-1} одговарала је карактеристичној фреквенцији протеина као и савијању вибрације О-Н повезане воде. Ову јаку вибрацију преклапала је специфична апсорпција аромата (C = C и C = O растезљиве вибрације), што је указивало на присуство фенолних једињења (Narki *u cap.*, 1997; Kozarski *u cap.*, 2012). Фреквенције у региону $1410-1310\text{ cm}^{-1}$ такође су одговарале О-Н групама фенола. Трака на $1450-1460\text{ cm}^{-1}$ одговара фреквенцијама савијања вибрација C-H алифатичног ланца (Narki *u cap.*, 1997). У аномерном региону ($950-700\text{ cm}^{-1}$) карактеристична слаба апсорпција на 890 cm^{-1} у свим узорцима одговарала је присуству β -гликозидних веза (C1-H деформациони режим).

(Sandula *u cap.*, 1999). Штавише, додатна слаба фреквенција на 935 cm^{-1} у В и С узорцима је такође била повезана са β -гликозидним везама (Chen *u cap.*, 2020).

FTIR спектри сваког испитиваног узорка полисахарида изолованог из *S. commune* Fr. задржали су сличне структурне карактеристике, апсорпције повезане са типичним узорком угљених хидрата, као и фреквенције које се односе на неке протеине и фенолна једињења.



Слика 12. FTIR спектри испитиваних ПСХ екстраката изолованих из *S. commune* Fr.; А – Ф, 14 дана, ИТА; В – БМ, 14 дана ИТА; С – БМ, 14 дана СРБ; D – Ф, 28 дана, СРБ.

5.6.2. Детерминација садржаја укупних протеина

Садржај укупних протеина одређен је у екстрактима Ф оба соја врсте *S. commune* Fr. применом методе по Lowry-ју (1951) у циљу провере продукције екстрацелуларних метаболита током инкубације. Култивација у потопљеној култури је трајала 28 дана, а свака три дана је одређиван садржај укупних протеина у Ф са циљем праћења тренда концентрације протеина током различитих фаза раста културе (Прилог 8.5.3., Табела 8.22.).

Код ИТА соја, већи садржај протеина је примећен у првим данима култивације, који је праћен силазним трендом и најнижим садржајем протеина забележеним након 21-ог дана култивације ($86,5 \pm 2,4$ mg албумина/g с.м.), након чега је уследио нагли пораст до краја инкубационог периода. Код СРБ соја је забележен равномернији тренд до 21-ог дана, након чега је уследио благи пад у садржају укупних протеина.

Највећи садржај протеина код ИТА соја је забележен након 14 дана култивације, док је код СРБ забележен 12-ог дана инкубације, што је у складу са резултатима FTIR анализе, где је уочена мања количина протеина и полифенолних једињења након 14 дана инкубације. Ово указује да су оба соја ушла у секундарни метаболизам негде на средини инкубационог периода, с обзиром да је највећа продукција протеина (примарни метаболит) била у првој половини инкубације. Међутим, пред крај култивације ИТА сој је у недостатку примарног извора угљеника, почео да користи алтернативни извор, односно сопствени производ (шизофилан) (Reyes *u cap.*, 2009), што потврђује нагли пораст концентрације протеина након 21 дан инкубације.

5.6.3. Детерминација садржаја угљених хидрата

Укупан садржај угљених хидрата одређен је у екстрактима Ф оба соја испитиване врсте гљиве након различитог периода инкубације (на свака три дана), а резултати су табеларно представљени (Прилог 8.5.3., Табела 8.22.). Највећи садржај угљених хидрата, односно глукозе примећен је на средини инкубационог периода (око 14-ог дана) код оба соја гљиве. Међутим, код СРБ соја концентрација глукозе се одржала до краја култивационог периода, односно до 28-ог дана, док је код ИТА соја примећен тренд благог опадања. Принос Ф (Прилог 8.1., График 8.2.) додатно поткрепљује ове резултате, с обзиром да је код ИТА соја принос почео да опада након средине инкубационог периода, док се код СРБ соја одржао до краја култивације. Ово указује да је ИТА сој брже ушао у *log* фазу, када је најинтензивније усвајање глукозе. Добијени резултати су у складу са очитаним FTIR спектрима, где је присуство доминантних угљенохидратних компоненти (α и β глукана) примећено након 14 дана. Поред тога, највећа концентрација изолованог шизофила је

управо примећена након 14 дана потопљене култивације, када је почео да опада ниво глукозе, с обзиром да је гљива искористила глукозу као примарни извор угљеника за продукцију шизофилана (Sim, 2014). Штавише, резултати додатно поткрепљују констатацију да су и примарни метаболити одговорни за испољавање јаке антиоксидативне и антиацетилхолинестеразне активности, с обзиром да су се екстракти култивисани 14 дана у потопљеној култури код оба соја, као и екстракт Ф култивисан 28 дана код СРБ соја, истакли као најпотентнији.

5.6.4. Детерминација садржаја укупних фенола

Укупан садржај фенола одређен је у ЕТ екстрактима оба соја врсте *S. commune* Fr. (Прилог 8.2.5., Табела 8.14.). Садржај фенола код оба соја је био висок и веома сличан, али је нешто већи садржај забележен код СРБ соја ($84,60 \pm 1,64$ за Ф и $82,62 \pm 0,99$ mg ек. ГК/g с.м. за БМ). Код оба соја је забележен већи укупни садржај фенола код Ф, у односу на екстракте БМ. Додатно, корелациона анализа између антиоксидативне активности и укупног садржаја фенола је показала позитивну везу између ОН есеја оба изолата и садржаја фенола ($r^2 = 0,81$ за ИТА сој и $r^2 = 0,71$ за СРБ сој, $p < 0,05$), као и позитивну корелацију између редукционог потенцијала испитиваних екстраката ИТА соја и садржаја фенола ($r^2 = 0,69$). Негативна корелација забележена је између АВТС есеја код СРБ изолата, где је корелациони коефицијент (r^2) износио $-0,79$, указујући да фенолна једињења нису одговорна за неутрализацију АВТС радикала.

5.6.5. LC-MS/MS анализа

У свим анализираним ПСХ и ЕТ екстрактима, од укупно 45 испитиваних фенола, 4 једињења су квантификована LC-MS/MS процедуром (Табела 6), док су остала фенолна једињења била изнад границе детекције, али ниже од границе квантификације (Прилог 8.5.4., Табела 8.27.). Детектоване су три хидроксибензојеве киселине и једна циклохексан карбоксилна киселина. *p*-хидроксибензојева киселина је откривена у свим испитиваним узорцима, док је значајно већи садржај утврђен код ИТА изолата (укупно $64,92 \mu\text{g/g}$).

Најзаступљеније једињење била је гална киселина пронађена у екстракту СРБ Ф (75,77 $\mu\text{g/g}$). У вези са тим, ЕТ екстракти су садржали већину анализираних фенолних киселина, док су Ф екстракти имали већи садржај фенола у односу на екстракте БМ (укупно 167,55 $\mu\text{g/g}$).

LC-MS/MS анализом екстраката из плодних тела ове врсте гљиве детектоване су само протокатехијске и хидроксибензојеве киселине у већим количинама (Mayakrishnan *и сар.*, 2013), док су у мањим количинама откривена различита фенолна једињења (Табела 6). Ова квантитативна и квалитативна варијабилност је очекивана с обзиром да различито порекло раста гљиве (мицелија односно биомаса и екстрацелуларни медијум односно филтрат) током потопљене култивације може произвести метаболите различитих класа и концентрације. Према криви раста, СРБ сој (Прилог 8.1., *График 8.2.*) има брз раст и достигао је критичну тачку уласка у секундарни метаболизам много раније (14 дана) од ИТА соја, када је примећена веома висока концентрација галне киселине. Штавише, висока редукција детектована FRAP есејем и јака неутрализација DPPH радикала код СРБ соја се може приписати галној киселини (Velderrain-Rodríguez *и сар.*, 2018). ИТА сој је показао критичне тачке између 21 и 28 дана (Прилог 8.1., *График 8.2.*) када су откривена различита фенолна једињења. Сва потврђена фенолна једињења (Табела 6) су доказани антиоксиданси (Rice-Evans *и сар.*, 1997; Kozarski *и сар.*, 2015), док је LC-MS/MS анализа показала већи садржај фенола у ЕТ екстрактима пошто је етанол јачи растварач од воде.

Стога, уочене активности ЕТ екстраката могу се објаснити присуством секундарних метаболита, док су примарни метаболити највероватније одговорни за високу скевенџер активност ПСХ екстраката. Поред тога, за јаку антибактеријску активност МЕ екстраката највероватније су одговорна фенолна једињења. Наиме, у МЕ екстрактима фенолна једињења и поједина неполарна једињења се екстрахују у већем приносу у поређењу са поларнијим воденим и ЕТ екстрактима, док терпеноиди, који испољавају јаку антимикробну активност, доминирају у неполарним растварачима, попут хлороформа, диетилетра и др. (Cowan, 1999; Karaman *и сар.*, 2009, Rašeta *и сар.*, 2023). Међутим, иако је раније документована анти-ацетилхолинестеразна активност за фенолна једињења и флавоноиде (Szwajgier, 2015), резултати ове докторске дисертације су указали на могућност

синергистичког ефекта како примарних (мешавина полисахаридне фракције, вероватно пизофилана), тако и секундарних метаболита (феноли) када је у питању инхибиција ацетилхолинестеразе, али и када се ради о антиоксидативној и антибактеријској активности.

Табела 6. Одређене концентрације одабраних фенолних једињења LC-MS/MS техником у испитиваним ПСХ и ЕТ екстрактима ($\mu\text{g/g}$ с.м.).

Екстракти	Класа анализираних једињења			
	Хидроксибензоеве киселине			Циклохексан карбоксилна киселина
	<i>p</i> -хидроксибензоева киселина	протокатехоична киселина	гална киселина	хинска киселина
ПСХ				
ИТА Ф 7 д	5,50	3,17	<12,2*	<3,05*
ИТА БМ 7 д	1,87	<1,525*	<12,2*	<3,05*
ИТА БМ 14 д	8,28	<1,525*	<12,2*	<3,05*
СРБ Ф 7 д	<1,525*	<1,525*	<12,2*	4,29
ЕТ				
ИТА Ф 14 д	3,81	<1,525*	<12,2*	13,24
ИТА Ф 21 д	9,51	<1,525*	<12,2*	<3,05*
ИТА БМ 14 д	4,10	<1,525*	<12,2*	8,57
ИТА БМ 21 д	9,66	<1,525*	<12,2*	<3,05*
ИТА БМ 28 д	22,19	5,41	<12,2*	4,82
СРБ Ф 7 д	12,14	<1,525*	<12,2*	15,51
СРБ Ф 14 д	3,77	<1,525*	75,77	<3,05*
СРБ Ф 21 д	11,25	1,90	<12,2*	<3,05*
СРБ Ф 28 д	7,69	<1,525*	<12,2*	<3,05*
СРБ БМ 7 д	5,93	<1,525*	<12,2*	19,52
СРБ БМ 14 д	5,94	<1,525*	<12,2*	20,06
СРБ БМ 21 д	6,52	<1,525*	<12,2*	5,49

* Вредност је изнад границе детекције, али нижа од границе квантификације.

5.7. Скрининг и селекција екстраката гљиве за биопрајминг семена грашка

Скрининг екстраката гљиве је подразумевао прелиминарни биопрајминг семена грашка (*Pisum sativum* L.) ПСХ и ЕТ екстрактима гљиве, припремљених након култивације у потопљеној култури. У оквиру предгеста, детаљно су анализирани ефекти биопрајминга ПСХ и ЕТ екстраката на енергију клијања, клијавост семена, дужину надземног дела и корена као и односа корен/надземни део. Поред тога, детерминисана је и маса свежег и сувог надземног дела биљке и корена, а сви резултати су приказани у Прилогу 8.6., Табела 8.36. и 8.37.

За разлику од ПСХ екстраката, ЕТ екстракти оба соја испитиване врсте гљиве нису показали значајне резултате на основу којих би се испитивао њихов даљи потенцијал за примену у пољопривредној пракси. Стога, даља истраживања у оквиру докторске дисертације била су усмерена ка примени ПСХ екстраката ИТА и СРБ соја гљиве *S. commune* Fr. у биопрајмингу семена грашка. Конкретно, екстракти из потопљених култура који су инкубирани 14 дана су селектовани као најперспективнији на основу параметара који ближе одређују квалитет семена и почетни пораст биљке. Сходно томе, други део дисертације је био усмерен на припрему ПСХ екстраката, биопрајминг семена грашка са изолованим ЕПСХ и ИПСХ, као и на испитивање квалитета семена и почетног пораста биљака након биопрајминга у оптималним условима и у условима водног дефицита (стреса суше).

5.8. Карактеризација егзо и интраполисахарида

5.8.1. FTIR анализа са микроанализом и укупним садржајем протеина

Резултати FTIR анализе изолованих ЕПСХ и ИПСХ су се поклапали са претходно снимљеним FTIR спектрима ПСХ екстракта гљиве *S. commune* Fr. код оба испитивана соја. Наиме, FTIR спектри анализираних ЕПСХ и ИПСХ су били врло слични и показивали суприсуство примеса, односно ароматичних једињења и протеина (Прилог 8.5.2.). Ово је потврдила и урађена микроанализа, која је доказала присуство азота у ИПСХ код оба соја, што указује на присуство протеина или других полимера који садрже азот, највероватније хитина. Садржај азота у ИПСХ се разликује код ИТА (3,15%) и СРБ (2,75%) соја, док су проценти угљеника и водоника приближно исти (Прилог 8.5.8., Табела 8.35.). Међутим, у поређењу са ЕПСХ из *S. commune* Fr. пореклом из Кине елемента (С, 25,84%; Н, 5,45% и N, 0,65%), уочен је већи проценат сва три једињења код екстракта ЕПСХ СРБ (С, 37,16%; Н, 6,69% и N, 3,16%) (Du *u cap.*, 2017b). Ово указује да се протеини највероватније нису у потпуности одвојили од протеин-глюкан комплекса за које су везани, с обзиром да је у узорцима богатим полисахаридима присутан мали проценат азота, углавном до 1% (Synytsya *u cap.*, 2009). Са друге стране, одређен је и садржај протеина у изолованим ИПСХ, који износи мање од 1% код оба соја (ИТА 0,6% и СРБ 0,9%), који указује да су у питању највероватније у води растворени протеини.

5.8.2. Congo red тест

С обзиром да конформација полисахарида може утицати на биоактивност (Chen *u cap.*, 2020), испитана је интеракција Congo red реагенса са ЕПСХ и ИПСХ оба соја, у распону од 400 до 600 nm (Прилог 8.5.5., Табела 8.29. и Табела 8.30.). Наиме, полисахариди који имају троструку хеликоидну конформацију са Congo red реагенсом могу формирати комплекс који изазива повећање таласне дужине односно вредности максималне апсорбанце (λ_{max}), у односу на контролу (Congo red реагенс). Међутим, базни услови могу да наруше ову промену.

Резултати су показали да се λ max кретала између 400 и 520 nm, у зависности од врсте анализираних полисахарида, као и концентрације раствора NaOH (График 1). Наиме, вредност λ max ИПСХ код ИТА соја је порасла на 485 nm при концентрацији раствора NaOH од 0,4 mg/mL, након чега је дошло до опадања и заравњења криве (λ max = 480 nm) без обзира на повећање концентрације NaOH, што указује да је дошло до губитка троструке хеликоидне конформације овог полисахарида изолованог из БМ. Слична ситуација је била и код ЕПСХ, изолованог из Ф, указујући да оба полисахарида код ИТА соја имају троструку хеликоидну конформацију. Ранија студија је показала да шизофилан, доминантан полисахарид присутан код *S. commune* Fr., има троструку хеликоидну структуру у воденим и слабо базним условима, која се нарушава при високим концентрацијама NaOH и прелази у слободно ланчану структуру (Rout *и сар.*, 2008). Стога се може рећи да изоловани ЕПСХ и ИПСХ из ИТА соја представљају управо β -глюкан, односно највероватније шизофилан, што потврђује и FTIR анализа ПСХ екстраката.

Обрнута ситуација је уочена код анализираних полисахарида СРБ соја. Наиме, код СРБ соја није било значајних промена у вредности λ max-а што указује да анализирани ЕПСХ и ИПСХ немају хеликоидну структуру. Доступни литературни подаци и претходне студије су потврдиле да хетерополисахариди не могу да формирају троструки хеликс (Shang *и сар.*, 2018; Chen *и сар.*, 2020), што указује да су анализирани ЕПСХ и ИПСХ код СРБ соја највероватније хетерополисахариди који егзистирају као слободни ланци. Поред тога, резултати FTIR анализе, као и микроанализе, су показали присуство малих количина протеина и других ароматика у изолованим ЕПСХ и ИПСХ-а, што указује на присуство комплекса полисахарида са поменутиим једињењима.

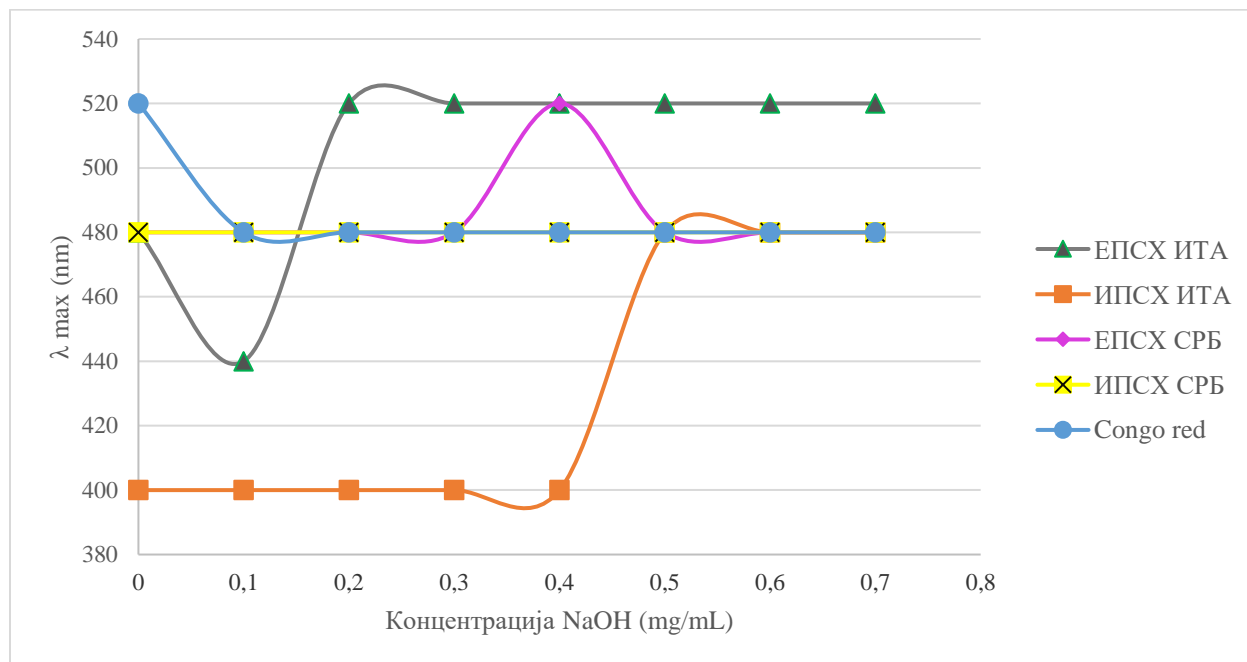


График 1. Компаративни преглед максималне апсорбанце Congo red теста езго- (ЕПСХ) интраполисахарида (ИПСХ) код СРБ и ИТА соја врсте *S. commune* Fr.

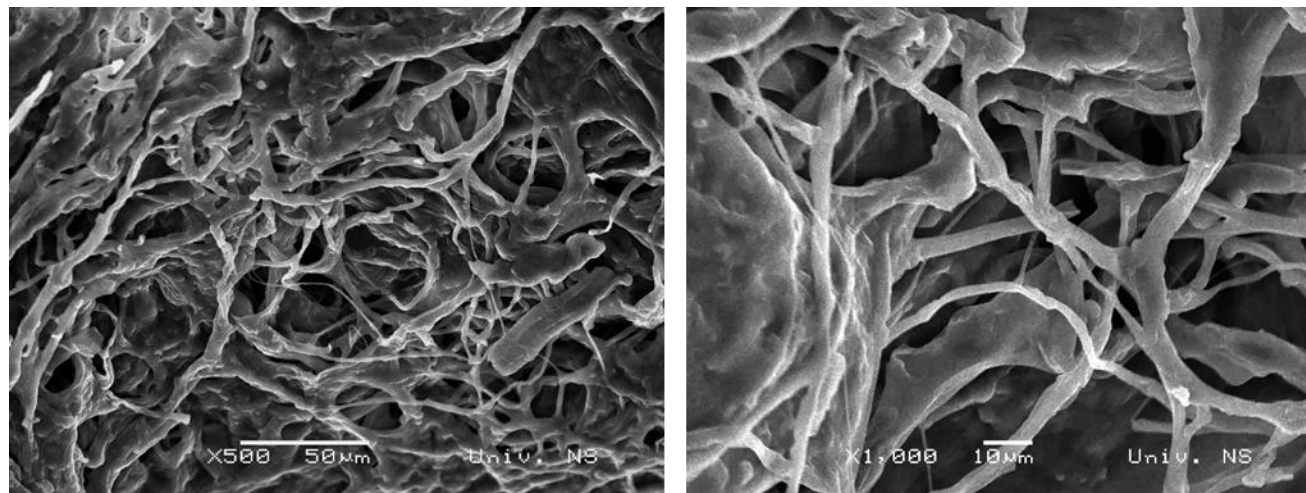
5.8.3. Скенинг електронска микроскопија (СЕМ)

ЕПСХ изоловани из оба соја врсте *S. commune* Fr. посматрани су коришћењем Скенинг електронског микроскопа у циљу анализе топографије ових полимера (Слика 13-16). Један део узорака је био сушен на ваздуху, а други део је лиофилизиран због провере утицаја сушења на добијену скенинг микрографију.

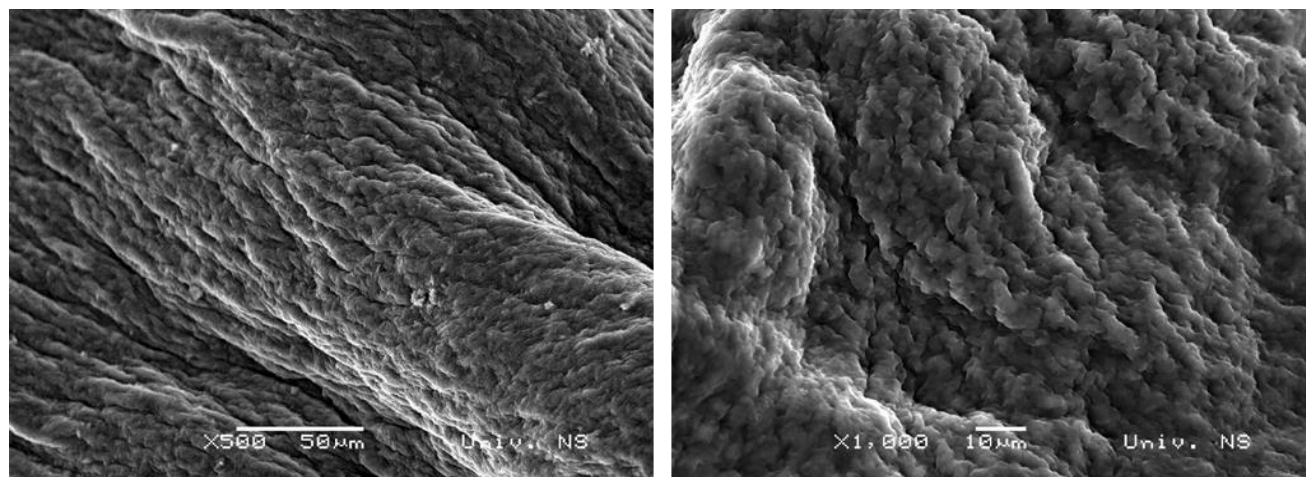
Уочена је разноврсност микроструктура анализираних ЕПСХ, односно морфологије површина различитих узорака су се јасно разликовале у облику и величини када је у питању начин сушења. Наиме, узорци сушени на ваздуху приказани на Сликама 14 и 16 су имали доста храпавију површину у односу на лиофилизиране полисахариде (Слике 13 и 15), што се може приписати денатурацији присутних протеина и раскидању водоничних веза и хидрофобних интеракција приликом процеса сушења (Widjanarko *и сар.*, 2011). Штавише, уочене су и разлике у структури ЕПСХ када је у питању порекло, односно сој испитиване врсте гљиве. Узорак СРБ соја који је ваздушно сушен показао је крупнију и компактнију структуру, док су код ИТА соја биле присутне ситније микроструктуре. Резултати су у

сагласности са литературним подацима који су потврдили да облик и структура полисахарида зависе од претходне обраде (Chen *u cap.*, 2015; Ma *u cap.*, 2016; Chen *u cap.*, 2020).

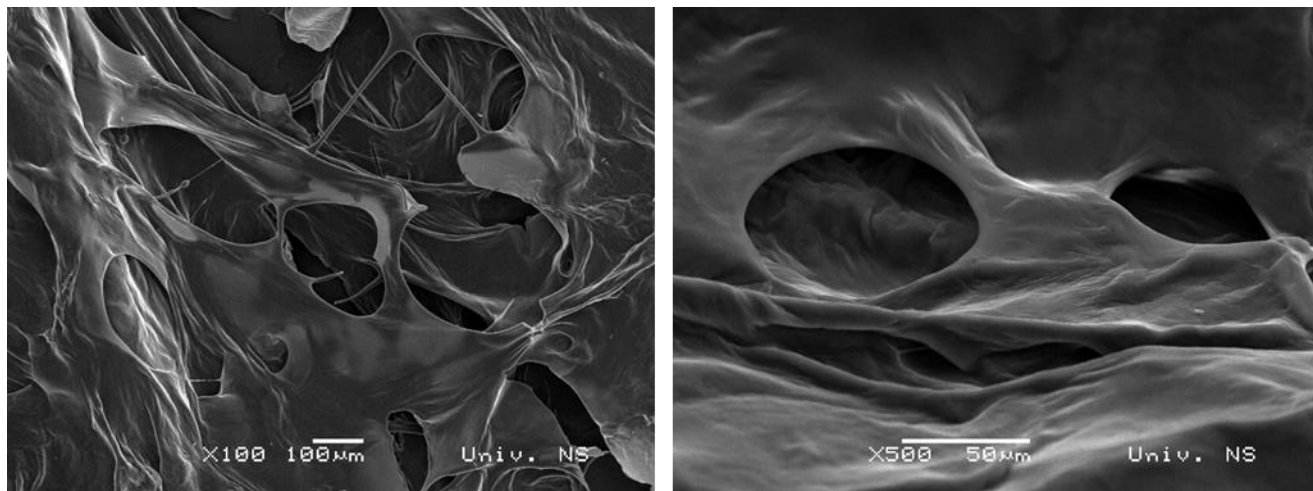
Са друге стране, када су у питању лиофилизирани узорци, јасно је видљива глатка површина са мрежастом структуром која садржи неправилне руптуре код оба соја (Слике 13 и 15). Скен електронска микроскопија ЕПСХ, изолованог из *S. commune* Fr. пореклом из Кине, је такође приказала хомогену структуру овог полимера са глатком и блиставом површином (Du *u cap.*, 2017b). Додатно, ЕПСХ пореклом из *S. radiatum* су имали глатку и танку површину, са присутним порама (López-Legardau *cap.*, 2021). Глатка површина је највероватније последица међусобне везе између донора протона водоника – ОН групе полисахарида (ЕПСХ) и акцептора водоника – НН групе протеина (Widjanarko *u cap.*, 2011), али и јачих међумолекуларних интеракција услед високе молекулске масе (López-Legardau *cap.*, 2021), које су остале очуване приликом поступка лиофилизације. Мрежаста структура ЕПСХ је настала услед водоничних интеракција између појединачних полисахаридних молекула, док је различит степен порозности последица водоничних веза између С-О фрагмената полисахарида и N-H фрагмената присутних протеина (Widjanarko *u cap.*, 2011). Већа порозност уочена код СРБ соја (Слика 15), резултати FTIR анализе и Bradford теста који су доказали присуство протеина, као и Congo red теста где је негирана хеликоидна структура, заједно потврђују да је анализиран ЕПСХ, изолован из СРБ соја, у ствари комплекс полисахарида (највероватније хетерополисахарида), протеина и секундарних метаболита. Такође, може се закључити да поред различитог порекла ЕПСХ, очигледан утицај на микроструктуру полисахарида има и начин сушења, односно припреме узорака.



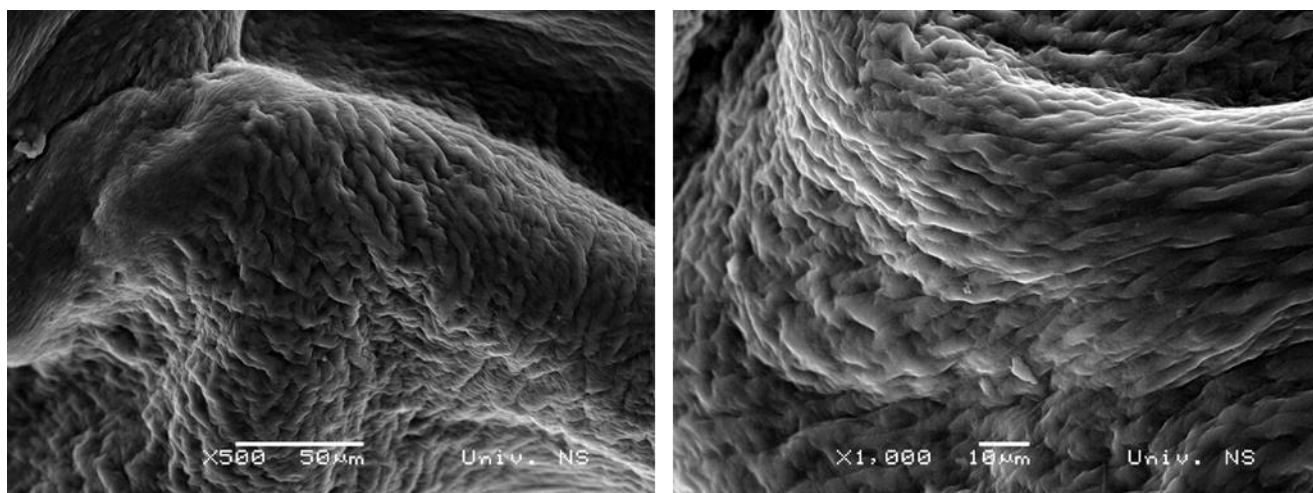
Слика 13. СЕМ микрографија ЕПСХ изолованог из ИТА соја врсте *S. commune* Fr. – лиофилизиран узорак, увећање 500 и 1000 пута



Слика 14. СЕМ микрографија ЕПСХ изолованог из ИТА соја врсте *S. commune* Fr. – узорак сушен на ваздуху, увећање 500 и 1000 пута



Слика 15. СЕМ микрографија ЕПСХ изолованог из СРБ соја врсте *S. commune* Fr.– лиофилизиран узорак, увећање 100 и 500 пута



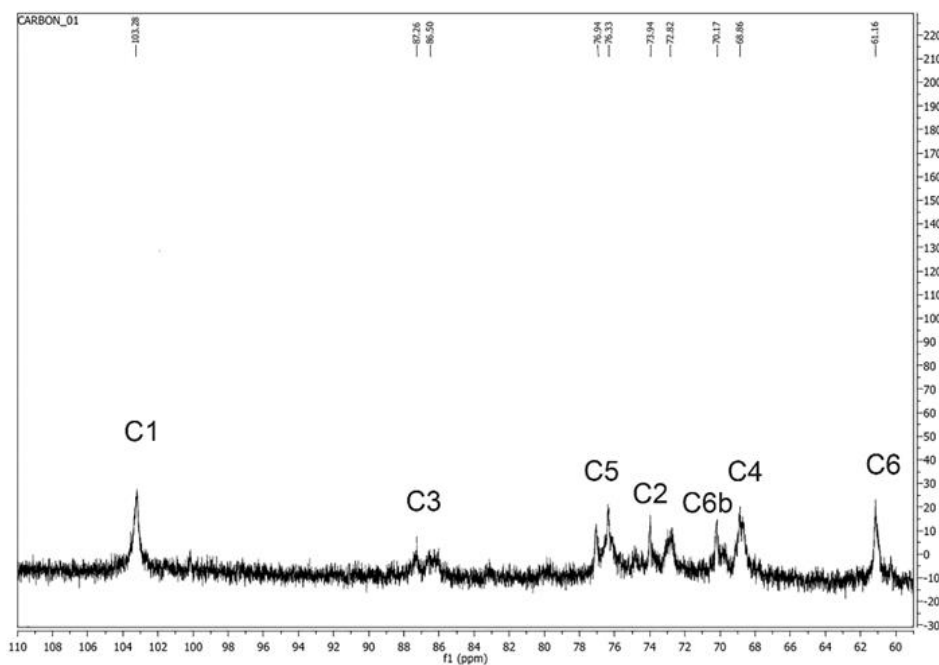
Слика 16. СЕМ микрографија ЕПСХ изолованог из СРБ соја врсте *S. commune* Fr. –узорак сушен на ваздуху, увећање 500 и 1000 пута

5.8.4. NMR анализа

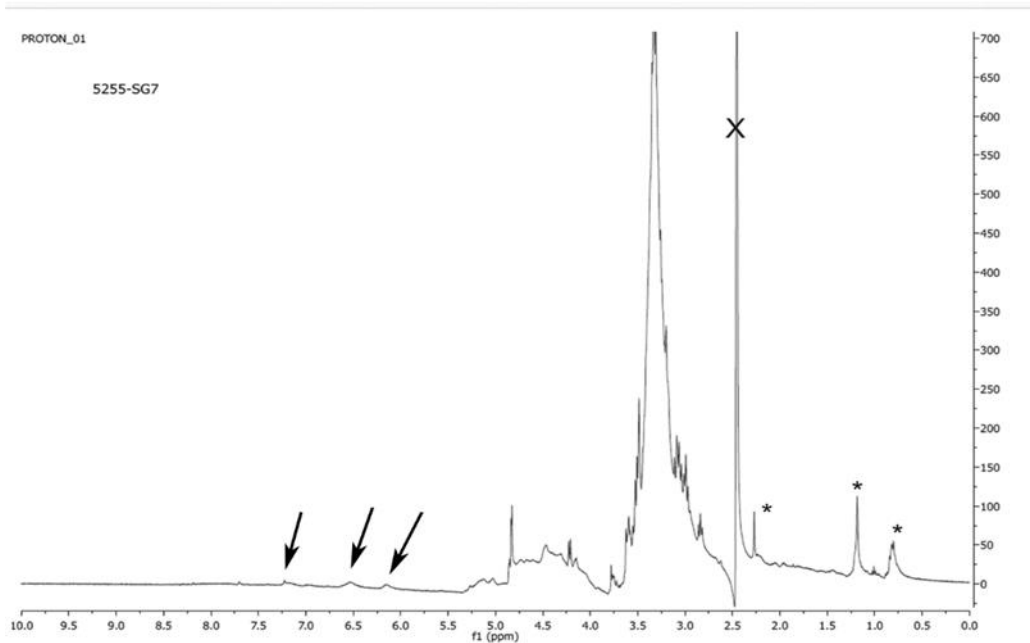
У оквиру NMR анализе изолованих ЕПСХ и ИПСХ, снимани су само протонски, односно ^1H -NMR спектри код оба соја врсте *S. commune* Fr. и приказани су на Сликама 17-21 и у Прилогу (Прилог 8.5.9.). Хемијска померања су изражена у ppm.

Спектри су били доста слични и примећен је широк пик у региону 3-3,5 ppm који одговара протонима H2-H6, док се пикови на 3,6, 4,2 и 4,5 ppm приписују протонима H6a, H1 у гранама, односно H1 основног низа. Код C13 спектра екстракта ИПСХ СРБ у области аномерног угљеника је присутан један сигнал на 103,28 ppm што указује на присуство β везе, док се пикови на 61,16 и 70,17 ppm могу приписати слободном C6 и везаном C6b из гранања (Слика 17). Положај и осталиј пикова је у складу са литературним подацима β глукана (Копо и сар., 2017). Одређени спектри су били лошијег квалитета и сигнали нису били јасно одвојени што се приписује ниској растворљивости узорака у диметилсулфоксиду (DMSO). Међутим, јасно су се могу уочити сигнали у области 3-5,5 ppm који потичу од полисахарида (Слика 18 и 19, ИПСХ СРБ). Пик на 2,5 ppm потиче од растварача DMSO, а три пика означена звездицом потичу од DSS (Sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate), стандарда који се додаје у узорке приликом NMR анализе (Слика 18). Међутим, код ЕПСХ узорака код оба соја су примећени вишеструки пикови у региону 1-3 ppm, који одговарају алифатичном једињењу без шећера присутном у траговима, што се подудара са раније објављеним NMR спектром ПСХ изолованог из *S. commune* Fr. пореклом са Авале (Србија) (Klaus и сар., 2011). Додатно, сигнали у том региону највероватније потичу од присутних протеина (Du и сар., 2017b). Пикови у области 6,5-9 ppm означени стрелицом потврђују присуство аромата у узорку, што су доказале и претходне анализе (FTIR, микроанализа, Bradford, Congo red, SEM), као и доступни литературни подаци (Klaus и сар., 2011). Штавише, интензитет ових пикова је знатно мањи у односу на пикове у области 3-5,5 ppm, што је у сагласности са доминантном полисахаридном структуром екстракта. Пик од воде присутне у узорку се налазио на 3,4 ppm и преклапао се са широким пицом за протоне H2-H6 шећера.

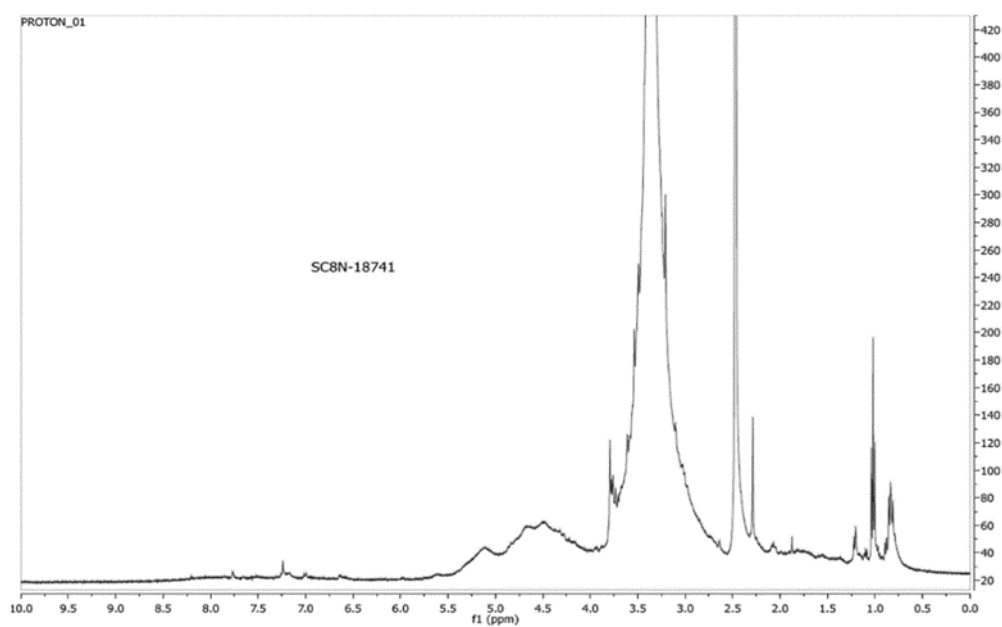
Са друге стране, код ензимски третираних узорака уочено је одсуство сигнала у ароматичној области, док су појединачни пикови боље раздвојени (Прилог 8.5.9.1.). Спектар ИПСХ код СРБ соја (Слика 18) упоређен је са литературним подацима за шизофилан из *S. commune* Fr. који је по структури низ D-глукозних јединица са β -1,3 везом у основном низу и гранањем у положају β -1,6 (Kim *и сар.*, 2000; Копо *и сар.*, 2017). Према литературним подацима, протону Н1 из основног низа се приписује пик на 4,5 ppm, а Н1 протону из гранања пик на 4,2 ppm (Копо *и сар.*, 2017). Однос интензитета ова два пика добијен интеграљењем је 1:0:4, што је апроксимативно у сагласности са литературним подацима који наводе 0,33 као степен гранања (Слика 21, Прилог 8.5.9.). Такође, издвојени пик на 3,6 ppm је приписан протону Н6а. Пикови на 4,65, 4,94 и 5,18 ppm највероватније одговарају протонима хидроксилних група у положајима 2,4 и 6.



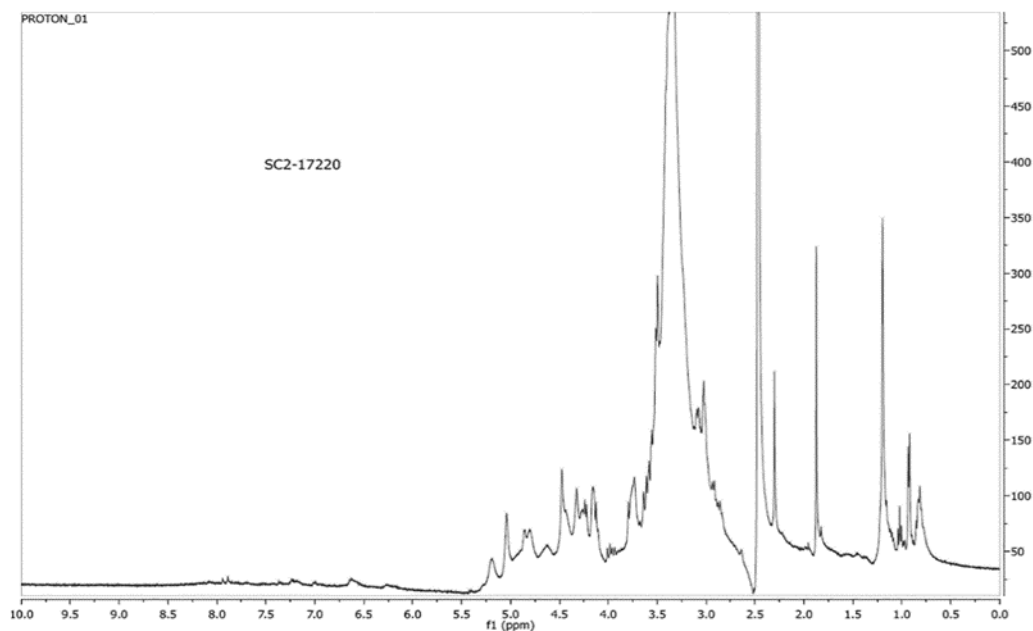
Слика 17. ^{13}C спектар ензимски третираног узорка ИПСХ СРБ



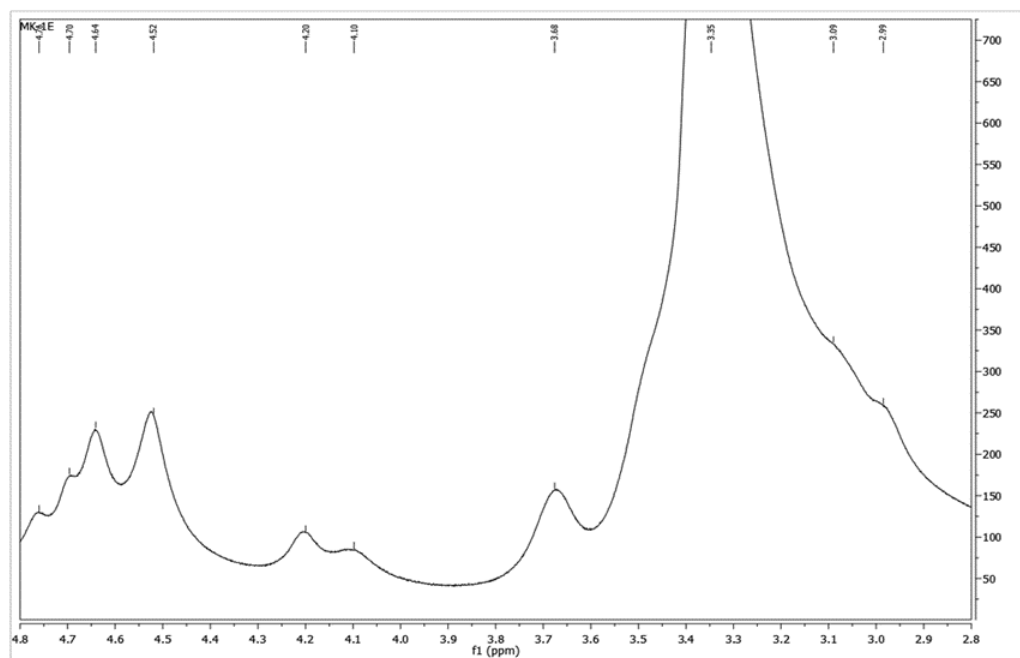
Слика 18. NMR спектар узорка ИПСХ СРБ у региону 0-10ppm



Слика 19. NMR спектар узорка ЕПСХ СРБ у региону 0-10 ppm



Слика 20. NMR спектар узорка ЕПСХ ИТА у региону 0-10 ppm



Слика 21. NMR спектар ензимски третираног узорка ЕПСХ ИТА у региону 2,8-4,8 ppm

5.9. Испитивање квалитета семена и почетног пораста биљака повртарског грашка након биопрајминга полисахаридима у оптималним условима и условима водног дефицита – суше

Клијање семена и ницање изданака представљају кључне фазе за добијање оптималног склопа усева, док бројни чиниоци, као што су услови током развоја семена и касније складиштења утичу на клијавост и виталност семена и стога су веома важни за обезбеђивање високих приноса усева (Miljковић *u cap.*, 2022). Из тог разлога, утврђен је квалитет семена грашка и оцењена је његова способност да произведе нормалне изданке у оптималним условима и у условима стреса суше применом стандардног теста клијавости. Добијени подаци су обрађени статистичким методама двофакторијалне и једнофакторијалне анализе варијансе, док је значајност разлика између средина тестирана применом Tukey HSD теста на нивоу значајности од $p < 0,05$ (Табела 7, Хистограм 8 и 9).

Двофакторијална анализа варијансе (Табела 7) је показала да је фактор стрес значајно утицао на све испитиване параметре на нивоу значајности од $p < 0,001$, сем код параметра АТ ($p < 0,01$). Такође, фактор третман је имао статистички значајан ефекат на све испитиване параметре на нивоу значајности од $p < 0,001$, сем код параметара АТ и СВН код којих је значајност испољена на нивоу $p < 0,01$. Поред тога, интеракција С х Т је статистички значајно утицала на све испитиване параметре ($p < 0,001$), сем на параметра АТ, код којег није испољена значајност, док је код параметра РСВ значајност испољена на нивоу $p < 0,01$.

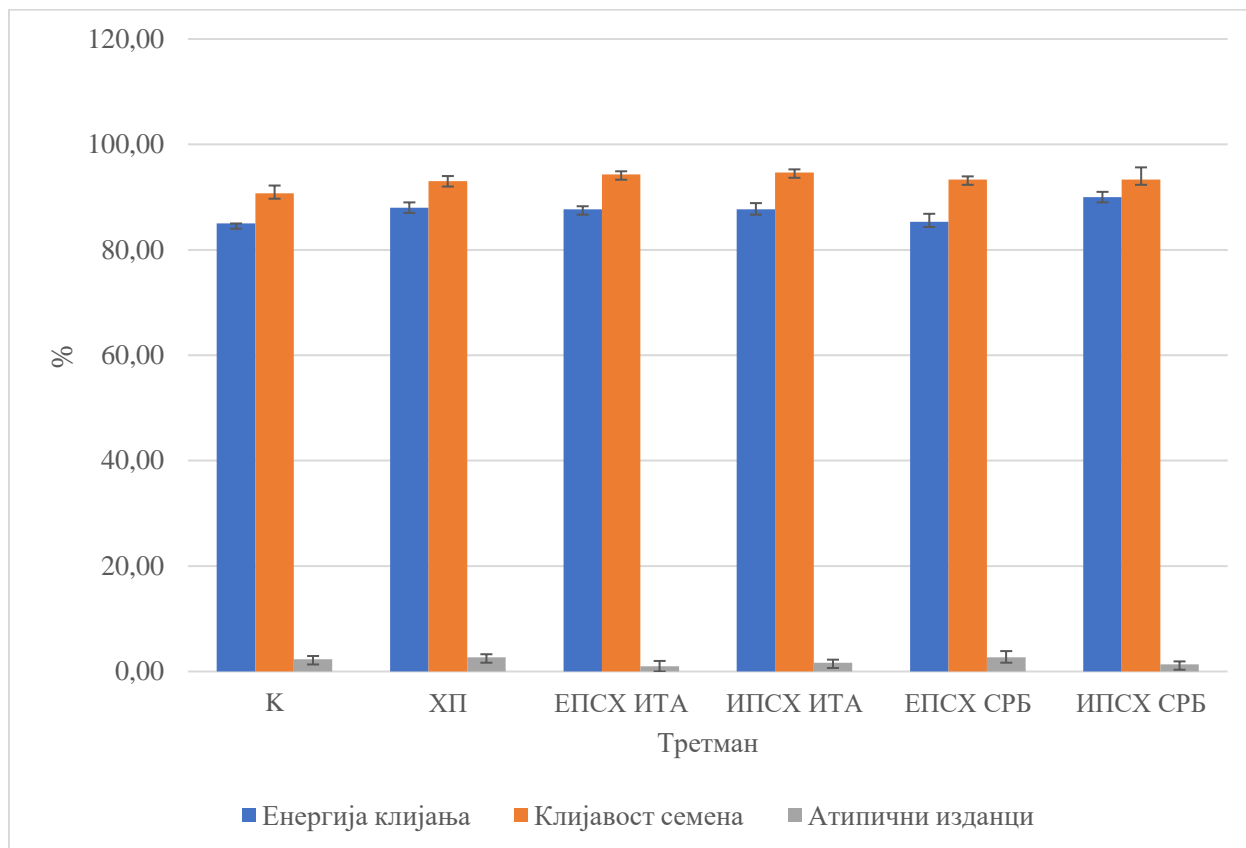
Табела 7. Двофакторијална анализа варијансе параметара квалитета повртарског грашка након биопрајминга полисахаридима изолованих из гљиве *S. commune* Fr. у оптималним условима и у условима стреса суше

Особина	С	Т	С x Т
Енергија клијања (ЕК)	***	***	***
Клијавост семена (КЈ)	***	***	***
Атипични изданци (АТ)	**	**	нз
Дужина надземног дела изданака (ДНД)	***	***	***
Дужина корена изданака (ДК)	***	***	***
Свежа маса надземног дела изданака (СВН)	***	**	***
Свежа маса корена изданака (СВК)	***	***	***
Сува маса надземног дела изданака (СУН)	***	***	***
Сува маса корена изданака (СУК)	***	***	***
Стопа издуживања надземног дела (СИН)	***	***	***
Стопа издуживања корена (СИК)	***	***	***
Вигор индекс (ИВИ)	***	***	***
Индекс стабилности мембране (ИСМ)	***	***	***
Пропустљивост електролита (ПЕ)	***	***	***
Релативан садржај воде (РСВ)	***	***	**
Индекс толерантности на сушу (ИТС)	***	***	***
Индекс толеранције дужине (пораства) надземног дела изданака на стрес (ИТН)	***	***	***
Индекс толеранције дужине (пораства) корена на стрес (ИТК)	***	***	***

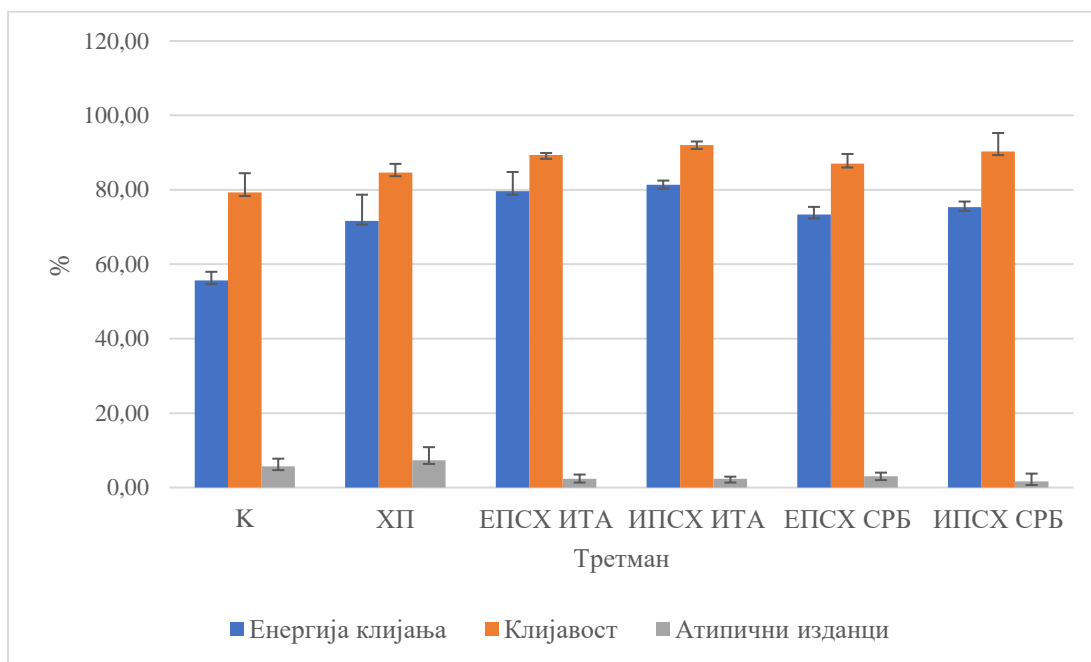
*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; нз – није значајно

Посматрајући утицај третмана у оквиру одређеног услова гајења (оптимални услови, стрес суше), биопрајминг полисахаридима гљиве *S. commune* Fr. оба соја је утицао на повећање енергије клијања и клијавости семена грашка у оптималним условима. Наиме, екстракт ИПСХ СРБ је утицао на повећање енергије клијања за 5,50% у односу на контролу, док је највећи проценат клијавости имало семе након биопрајминга са полисахаридима (ЕПСХ и ИПСХ) изолованим из ИТА соја (94,70%) (Хистограм 8). Такође, нису забележене

статистички значајне разлике у погледу удела атипичних изданака код испитиваних третмана. Међутим, стресни услови суше симулиране употребом раствора ПЕГ су у значајној мери имали негативан утицај на енергију клијања семена грашка и редуковали су је за 34,50% у контроли. Поред тога, клијавост семена је била смањена за 12,60% у условима суше. Смањење клијавости је највероватније последица повећања временске дужине која одговара фази III процеса имбибиције, као и високе молекулске тежине ПЕГ-а, који се не усваја због високог вискозитета, и заједно са одговарајућом ниском дифузијом O₂, може угрозити снабдевање семена кисеоником током процеса клијања (Braccini *u cap.*, 1996; Pereira *u cap.*, 2020; Tamindžić *u cap.*, 2021b). Међутим, анализа варијансе је показала значајан позитиван ефекат полисахарида на енергију клијања и клијавост семена у поређењу са контролом и хидропрајмингом ($p < 0,05$). Наиме, енергија клијања након биопрајминга са екстрактом ИПСХ ИТА је била за 46,00% већа у односу на контролу, док је клијавост семена повећана за 16,00% у сушним условима (Хистограм 8 и 9). Семе третирано полисахаридима изолованим из СРБ соја је имало за 31,60% (ЕПСХ СРБ), односно за 35,20% (ИПСХ СРБ) већу енергију клијања и за 9,70%, односно 13,90% већу клијавост семена у односу у контроли (Хистограм 8). Процент атипичних изданака је у оптималним условима, као и у условима суше био редукован. (Хистограм 8 и 9).



Хистограм 8. Графички приказ ефекта биопрајминга полисахаридима изолованих из гљиве *S. commune* Fr. у оптималним условима на параметре испитивања квалитета семена грашка



Хистограм 9. Графички приказ ефекта биопрајминга полисахаридима изолованим из *S. commune* Fr. у условима стреса (суша) на параметре испитивања квалитета семена грашка

С обзиром да квалитет семена утиче на брзину и уједначеност ницања грашка, као и на брзину почетног пораста биљака (Таминдџић и сар., 2023), испитани су и параметри квалитета почетног пораста грашка након биопрајминга полисахаридима гљиве у оптималним условима и условима водног дефицита – суше. На параметре пораста грашка значајно су утицали третмани биопрајминга, како у оптималним условима, тако и у условима стреса суше и резултати су приказани табеларно (Табела 8 и 9). Дужина надземног дела изданака повртарског грашка у контроли у оптималним условима је у просеку износила 55 mm, док је код свих испитиваних третмана уочено статистички значајно повећање дужине надземног дела у односу на контролу ($p < 0,05$). Највеће повећање је уочено код биопрајминга са екстрактима ИТА соја (17,30% и 10,60%, респективно). Стресни услови суше довели су до смањења дужине надземног дела изданака грашка за 52,70%, а сви испитивани третмани су имали позитиван утицај на овај параметар. Међутим, у условима суше, екстракти СРБ соја су испољили боље дејство у поређењу са осталим третманима и довели су до повећања дужине надземног дела изданака од 45% и 43,50%, респективно у поређењу са контролом. Надаље, биопрајминг је имао значајан утицај и на дужину корена

изданака у оптималним условима и у условима суше у поређењу са контролом и хидропрајминг. Ипак, највеће вредности дужине корена су забележене код биопрајминга са екстрактима СРБ соја (Табела 8).

Биопрајминг семена у оптималним условима је није испољио статистички значајан утицај на свежу масу надземног дела изданака грашка у поређењу са контролом (Табела 8). Међутим, у условима водног дефицита, третмани полисахаридима СРБ соја су испољили значајан утицај на свежу масу надземног дела изданака. Свежа маса надземног дела изданка је повећана за 37,30% након биопрајминга са ЕПСХ СРБ и за 20,30% након биопрајминга са ИПСХ СРБ у поређењу са контролом. Када је у питању свежа маса корена, јасно се може уочити да је стрес суше негативно утицао на овај параметар, где је анализом резултата утврђено да је смањење износило 53,00% у односу на контролу (Табела 8). Такође, анализа варијансе је показала значајан утицај третмана на овај параметар и у оптималним условима и у условима стреса суше. Сви третмани су довели до повећања свеже масе корена у оптималним условима, једино код третмана екстрактима ИПСХ СРБ повећање није било статистички значајно. Највеће вредности овог параметра забележене су након биопрајминга са екстрактима ЕПСХ ИТА и ИПСХ СРБ (17,80% и 13,90%, респективно) у поређењу са контролом (Табела 8). У условима водног дефицита, анализа варијансе је показала да су сви третмани испољили позитиван и статистички значајан утицај на овај параметар. Такође, уочен је и сличан образац утицаја биопрајминга у оптималним условима, где су екстракти ЕПСХ ИТА и ИПСХ СРБ испољили најбољи ефекат на масу свежег корена у поређењу са контролом (15,50% и 27,50%, респективно) (Табела 8).

Током истраживања праћена је и акумулација суве масе надземног дела и корена биљака у оптималним и стресним условима (суша) (Табела 8). Као и код претходних параметара, суша је утицала на редукуцију суве масе надземног дела за 44,80% и редукуцију суве масе корена за 40,10% у односу на контролу. У оптималним условима, једино статистички значајно повећање суве масе надземног дела је забележено у третману биопрајминга са екстрактима ЕПСХ ИТА (24,50%) у поређењу са контролом. Супротно овоме, у стресним условима суше, сви испитивани третмани су испољили значајан утицај на повећање суве масе надземног дела. Највећа вредност суве масе је забележена након

биопрајминга са екстрактима ЕПСХ СРБ (0,1434 g), што је било за 25,90% више него у контроли (Табела 8). Надаље, анализа варијансе је такође показала значај ефекат стреса на суву масу корена, где је редукција у контроли била 40,10%. У оптималним условима, издвојили су се третмани са екстрактима СРБ соја, који су довели до повећања суве масе корена за 11,00% и 7,20%, респективно у поређењу са контролом, што је приказано у Табели 8. Међутим, у стресним условима суше, забележено је статистички значајно повећање суве масе корена код свих испитиваних третмана у поређењу са контролом. Међу тестраним третманима, биопрајминг са ЕПСХ ИТА се издваја као најефикаснији с обзиром да је у овом третману забележено повећање суве масе корена за 30,20% у односу на контролу.

У овом истраживању праћен је и квалитативни параметар вигор индекс, као добар показатељ виталности и животне способности (вигора) семена. Вигор семена је веома сложена особина која обухвата толеранцију на старење, дормантност семена, животну способност, брзо клијање и формирање изданака, посебно у неповољним условима и условљена је неколицином фактора везаних за генетику и утицај спољашње средине (Reed *и сар.*, 2022). Резултати истраживања су јасно показали да су стресни услови суше утицали и на овај параметар и да је редукција вигор индекса у контроли износила чак 53,40% (Табела 8). Резултати су јасно показали да су сви испитивани третмани статистички значајно утицали на овај параметар у односу на контролу и у оптималним условима и у условима водног дефицита. У оптималним условима, највеће вредности вигор индекса забележене су у третману са ИПСХ СРБ у поређењу са контролом (1694,60), што је било за 24,90% веће у односу на контролу. Такође, јасно се може уочити и да су полисахариди СРБ соја, као и код претходних параметара, имали најбољи ефекат у условима суше, где је забележено значајно повећање за 100,00% (ЕПСХ СРБ), односно 109,00% (ИПСХ СРБ) у односу на контролу.

Табела 8. Ефекат биопрајминга полисахаридима изолованих из *S. commune* Fr. на дужину надземног дела и корена биљке грашка, свежу и суву масу надземног дела и корена изданака и vigor индекс у оптималним условима и стресним условима (суша)

Третман	ДНД (mm)	ДК (mm)	СВН (g)	СВК (g)	СУН (g)	СУК (g)	ИВИ
Оптимални услови							
К	55,00 ± 1,50 ^d	94,70 ± 2,90 ^d	2,37 ± 0,17 ^{ab}	2,08 ± 0,04 ^c	0,2064 ± 0,009 ^{bc}	0,1820 ± 0,001 ^c	1356,80 ± 7,30 ^e
ХП	59,0 ± 0,90 ^{bc}	97,0 ± 2,0 ^d	2,48 ± 0,11 ^b	2,16 ± 0,02 ^b	0,2421 ± 0,015 ^{ab}	0,1785 ± 0,002 ^c	1450,80 ± 21,50 ^d
ЕПСХ ИТА	64,50 ± 0,09 ^a	114,5 ± 3,30 ^b	2,76 ± 0,11 ^b	2,45 ± 0,02 ^a	0,2569 ± 0,023 ^a	0,1831 ± 0,001 ^c	168,70 ± 39,70 ^{ab}
ИПСХ ИТА	60,80 ± 0,70 ^b	105,7 ± 3,3 ^c	2,48 ± 0,06 ^b	2,37 ± 0,05 ^a	0,2092 ± 0,005 ^{bc}	0,1847 ± 0,001 ^c	1576,1 ± 30,6 ^c
ЕПСХ СРБ	57,20 ± 0,70 ^{cd}	115,90 ± 1,10 ^b	1,98 ± 0,16 ^a	2,20 ± 0,01 ^b	0,1844 ± 0,008 ^c	0,2020 ± 0,005 ^a	1615,50 ± 24,00 ^{bc}
ИПСХ СРБ	57,60 ± 2,20 ^{bcd}	123,90 ± 1,50 ^a	2,03 ± 0,25 ^a	2,13 ± 0,02 ^{bc}	0,1957 ± 0,021 ^c	0,1950 ± 0,002 ^b	1694,60 ± 29,80 ^a
Суша							
К	26,00 ± 0,50 ^d	53,50 ± 4,30 ^e	1,18 ± 0,12 ^c	1,42 ± 0,03 ^d	0,1139 ± 0,003 ^c	0,1091 ± 0,005 ^c	632,00 ± 73,40 ^d
ХП	27,30 ± 1,30 ^d	72,50 ± 3,50 ^d	1,37 ± 0,05 ^{bc}	1,61 ± 0,06 ^{bc}	0,1288 ± 0,006 ^b	0,1291 ± 0,002 ^b	844,70 ± 9,50 ^c
ЕПСХ ИТА	33,90 ± 0,90 ^b	88,80 ± 4,20 ^c	1,35 ± 0,07 ^{bc}	1,64 ± 0,01 ^b	0,1315 ± 0,002 ^b	0,1420 ± 0,006 ^a	1096,5 ± 9,50 ^c
ИПСХ ИТА	30,80 ± 1,10 ^c	87,30 ± 2,90 ^c	1,31 ± 0,04 ^{bc}	1,81 ± 0,04 ^a	0,1324 ± 0,003 ^b	0,1360 ± 0,002 ^{ab}	1087,40 ± 44,10 ^b
ЕПСХ СРБ	37,70 ± 0,90 ^a	119,80 ± 1,90 ^a	1,62 ± 0,10 ^a	1,56 ± 0,02 ^{bc}	0,1434 ± 0,002 ^{bc}	0,1325 ± 0,002 ^{ab}	1369,80 ± 42,60 ^a
ИПСХ СРБ	37,30 ± 0,50 ^a	108,9 ± 2,20 ^b	1,42 ± 0,09 ^{ab}	1,54 ± 0,03 ^c	0,1329 ± 0,003 ^b	0,1332 ± 0,006 ^{ab}	1320,90 ± 88,90 ^a

*Подаци су представљени као средња вредност три понављања ± стандардна девијација. Разлике између третмана су анализирани применом ANOVA, као и post-hoc Tukey HSD теста (p < 0,05).

^{a,b,c}У свакој колони (оптимални услови и суша) различити суперскрипт указује на статистичку значајност.

**ДНД – дужина надземног дела након 8 дана; ДК – дужина корена након 8 дана; СВН – свежа маса надземног дела изданака; СВК – свежа маса корена; СУН – сува маса надземног дела изданака; СУК сува маса корена; ИВИ – vigor индекс.

Испитивање ефеката биопрајминга грашка полисахаридима изолованим из гљиве *S. commune* Fr. су обухватила и праћење стопе издуживања надземног дела и корена изданка, односа корена и надземног дела изданка, индекс стабилности мембране и пропустљивост електролита (Табела 9). Резултати истраживања су показали, као и код претходних параметара, да је суша значајно редуковала стопу издуживања надземног дела и корена у контроли (Табела 9). Такође, анализа варијансе је показала статистички значајно повећање стопе издуживања надземног дела изданка у третманима са ЕПСХ ИТА и ЕПСХ СРБ (11,40% и 17,60%, респективно) у односу на контролу у оптималним условима. У условима суше, сви испитивани третмани су значајно повећали стопу издуживања надземног дела у поређењу са контролом, а међу њима највише се издвајају третмани са екстрактима СРБ соја (54,70% и 50,80%). Када је реч о стопи издуживања корена, статистички значајно повећање забележено је у третманима са ЕПСХ СРБ и ИПСХ СРБ и у оптималним условима и у стресним условима суше. Такође, у условима суше, полисахариди ИТА соја су такође показали позитиван ефекат на овај параметар, али у мањој мери од полисахарида СРБ соја (Табела 9).

Однос корена и надземног дела изданка је параметар који указује на односмасе биљног ткива са потпорним функцијама (корен) у поређењу са масом биљног ткива са функцијом раста (изданци). Током почетка фазе вегетације, раст корена утиче на раст надземних делова биљке, а већи однос корен/надземни део утиче на повећање приноса усева. Овај параметар у многоме зависи од снабдевања нутријентима, али и од масе семена (Mašková и Herben, 2018) и стога је праћење овог параметра било од значаја за ова истраживања. Резултати су показали да је ефекат третмана био статистички значајан у погледу односа корен/надземни део у поређењу са контролом (Табела 9). У оптималним условима, значајно повећање вредности овог параметра забележено је након биопрајминга са ЕПСХ СРБ (2,03) у поређењу са контролом (1,72), док је значајно смањење забележено након биопрајминга са ИПСХ СРБ (1,00). У условима водног дефицита, значајно повећање је забележено након хидропрајминга и биопрајминга са полисахаридима ИТА соја, док је у третманима са полисахаридима СРБ соја забележено значајно смањење односа корен/надземни део у односу на контролу (Табела 9).

Надаље, добијени резултати су показали и значајно варирање параметара индекс стабилности мембране и пропустљивост електролита између испитиваних третмана. Праћење ових параметара било је од великог значаја за ова истраживања, с обзиром да ови параметри указују на утицај оксидативног стреса у условима суше и оштећење липидних мембрана услед стварања реактивних кисеоничних врста, посебно у фотосинтетички органелама (Sakya *и сар.*, 2018). Како наводе Almeselmani *и сар.* (2011), ово може довести до директне оксидације липидне мембране тако да се њихова пермеабилност повећава и изазива цурење јона. Резултати истраживања су показали да је суша утицала на смањење индекса стабилности мембране (10,30%) и повећање пропустљивости електролита (43,90%) у контроли (Табела 9). Такође, уочен је и сличан, али обрнут образац у одговору на испитиване третмане па је тако у оптималним условима забележено да је биопрајминг са ИПСХ ИТА имао најзначајнији позитиван ефекат на ове параметре у односу на контролу. У условима водног дефицита, најбољи ефекат су испољили полисахариди ИТА соја у поређењу са контролом (Табела 9).

Табела 9. Ефекат биопрајминга полисахаридима изолованих из *S. commune* Fr. на стопу издуживања надземног дела, стопу издуживања корена, однос корен/надземни део, индекс стабилности мембране и пропустљивост електролита у оптималним условима и стресним условима (суша)

Третман	СИН	СИК	ОКН	ИСМ	ПЕ
Оптимални услови					
К	20,21 ± 0,41 ^c	9,19 ± 1,10 ^b	1,72 ± 0,10 ^b	81,00 ± 0,18 ^b	19,00 ± 0,18 ^b
ХП	10,21 ± 0,22 ^c	9,14 ± 0,91 ^b	1,64 ± 0,06 ^b	81,88 ± 0,52 ^b	18,12 ± 0,52 ^b
ЕПСХ ИТА	11,37 ± 0,21 ^{ab}	10,94 ± 1,22 ^b	1,78 ± 0,06 ^b	81,78 ± 0,38 ^b	18,22 ± 0,38 ^b
ИПСХ ИТА	10,47 ± 0,37 ^{bc}	10,80 ± 1,36 ^b	1,74 ± 0,05 ^b	83,99 ± 0,22 ^a	16,01 ± 0,22 ^c
ЕПСХ СРБ	12,01 ± 0,39 ^a	14,78 ± 0,47 ^a	2,03 ± 0,04 ^a	71,07 ± 0,51 ^c	28,93 ± 0,51 ^a
ИПСХ СРБ	10,07 ± 0,62 ^c	13,92 ± 0,65 ^a	1,00 ± 0,07 ^c	71,67 ± 1,06 ^c	28,33 ± 1,06 ^a
Суша					
К	5,91 ± 0,30 ^c	5,73 ± 1,50 ^d	2,05 ± 0,38 ^b	72,66 ± 1,04 ^b	27,34 ± 1,04 ^a
ХП	4,40 ± 0,41 ^d	6,83 ± 1,25 ^d	2,65 ± 0,21 ^a	72,48 ± 0,79 ^b	27,52 ± 0,79 ^a
ЕПСХ ИТА	7,03 ± 0,36 ^b	13,31 ± 1,73 ^c	2,63 ± 0,48 ^a	81,99 ± 0,93 ^a	18,01 ± 0,93 ^b
ИПСХ ИТА	6,09 ± 0,35 ^c	11,50 ± 1,17 ^c	2,83 ± 0,09 ^a	82,37 ± 0,81 ^a	17,63 ± 0,81 ^b
ЕПСХ СРБ	9,14 ± 0,28 ^a	22,23 ± 1,69 ^a	0,92 ± 0,02 ^c	71,93 ± 0,67 ^b	28,07 ± 0,67 ^a
ИПСХ СРБ	8,91 ± 0,25 ^a	18,23 ± 0,58 ^b	1,00 ± 0,11 ^c	72,15 ± 1,04 ^b	27,85 ± 1,04 ^a

*Подаци су представљени као средња вредност три понављања ± стандардна девијација. Разлике између третмана су анализиране применом ANOVA, као и post-hoc Tukey HSD теста ($p < 0,05$).

^{a,b,c}У свакој колони (оптимални услови и суша) различити суперскрипт указује на статистичку значајност.

**СИН – стопа издуживања надземног дела изданака; СИК – стопа издуживања корена изданака; ОКН – однос корен/надземни део; ИСМ – индекс стабилности мембране; ПЕ – пропустљивост електролита.

Поред наведеног, праћен је релативан садржај воде и физиолошки индекси, индекс толерантности на сушу, индекс толерантности надземног дела изданака на стрес и индекс толерантности корена изданака на стрес (Табела 10). Релативан садржај воде је веома важан индикатор водног статуса биљке и одражава равнотежу између снабдевања ткива листа водом и брзине транспирације (Soltys-Kalina *и сар.*, 2016). Анализа варијансе је показала да је ефекат стреса статистички значајно утицао на релативан садржај воде (Табела 10). Смањење релативног садржаја воде услед суше у контроли је износила 11,10%. Најбољи ефекат на повећање релативног садржаја воде и у оптималним условима и у суши су

испољили полисахариди СРБ соја, где је повећање ишло до 3,20% (ИПСХ СРБ) у оптималним условима и 8,10% (ИПСХ СРБ) у суши. Надаље, резултати су показали да испитивани третмани нису значајније утицали на индекс толерантности на сушу у оптималним условима, сем код биопрајминга са ЕПСХ ИТА, где је забележено значајно повећање од 13,00% у односу на контролу (Табела 10). У условима водног дефицита, сви испитивани третмани су довели до значајног повећања индекса толерантности на сушу у поређењу са контролом. Међу испитиваним третманима, најбољи ефекат су испољили ЕПСХ ИТА (23,00%) и ЕПСХ СРБ (24,00%). Када је реч о индексу толерантности надземног дела изданака на стрес и индексу толерантности корена изданака на стрес, испитивани третмани су различито утицали на ове параметре. Тако, у оптималним условима, хидропрајминг и полисахариди ИТА соја су довели до значајног повећања ИТН у поређењу са контролом, док је у условима суше уочено статистички значајно повећање индекса толерантности надземног дела изданака на стрес након биопрајминга са полисахаридима ИТА и СРБ соја. Такође, сви испитивани третмани сем хидропрајминга су позитивно утицали на индекс толерантности корена изданака на стрес у оптималним условима и у стресним условима суше (Табела 10).

Табела 10. Ефекат биопрајминга полисахаридима изолованих из *S. commune* Fr. на релативан садржај воде, индекс толерантности на сушу, индекс толерантности надземног дела изданака на стрес и индекс толерантности корена изданака на стрес у оптималним условима и стресним условима (суша)

Третман	РСВ	ИТС	ИТН	ИТК
Оптимални услови				
К	81,80 ± 0,70 ^{bc}	1,00 ± 0,00 ^b	100,00 ± 0,00 ^c	100,00 ± 0,00 ^d
ХП	81,90 ± 0,30 ^{bc}	1,08 ± 0,03 ^{ab}	107,30 ± 1,80 ^b	102,50 ± 1,70 ^{cd}
ЕПСХ ИТА	81,30 ± 1,20 ^c	1,13 ± 0,06 ^a	117,30 ± 2,00 ^a	121,20 ± 6,70 ^{ab}
ИПСХ ИТА	82,30 ± 0,50 ^{bc}	1,01 ± 0,03 ^b	110,70 ± 3,80 ^{ab}	111,70 ± 4,40 ^{bc}
ЕПСХ СРБ	83,10 ± 1,10 ^{ab}	0,99 ± 0,02 ^b	104,00 ± 3,40 ^{bc}	122,60 ± 4,60 ^{ab}
ИПСХ СРБ	84,40 ± 0,50 ^a	1,01 ± 0,04 ^b	104,70 ± 2,10 ^{bc}	131,00 ± 3,20 ^a
Суша				
К	72,70 ± 1,10 ^{bc}	1,00 ± 0,00 ^c	100,00 ± 0,00 ^d	100,00 ± 0,00 ^d
ХП	71,80 ± 0,60 ^c	1,16 ± 0,03 ^b	105,20 ± 6,00 ^d	135,90 ± 8,80 ^{cd}
ЕПСХ ИТА	75,30 ± 0,20 ^{ab}	1,23 ± 0,01 ^a	130,40 ± 0,80 ^b	167,20 ± 22,20 ^{bc}
ИПСХ ИТА	74,20 ± 0,8 ^{bc}	1,20 ± 0,01 ^{ab}	118,60 ± 5,00 ^c	164,20 ± 18,10 ^{bc}
ЕПСХ СРБ	75,80 ± 1,90 ^{ab}	1,24 ± 0,01 ^a	144,90 ± 2,60 ^a	224,80 ± 15,40 ^a
ИПСХ СРБ	78,60 ± 1,80 ^a	1,19 ± 0,03 ^{ab}	143,40 ± 4,30 ^a	204,50 ± 18,06 ^{ab}

*Подаци су представљени као средња вредност три понављања ± стандардна девијација. Разлике између третмана су анализиране применом ANOVA, као и post-hoc Tukey HSD теста ($p < 0,05$).

^{a,b,c}У свакој колони (оптимални услови и суша) различити суперскрипт указује на статистичку значајност.

**РСВ – релативан садржај воде; ИТС – индекс толерантности на сушу; ИТН – индекс толерантности надземног дела изданака на стрес; ИТК – индекс толерантности корена изданака на стрес.

5.9.1. Корелациона анализа

Корелациона анализа је потврдила значајан ефекат биопрајминга полисахаридима изолованих из *S. commune* Fr. на квалитет семена и почетни пораст повртарског грашка у оптималним условима и стресним условима суше (Слика 22). Резултати су показали да је у оптималним условима утврђена високо значајна позитивна корелација између дужине надземног дела изданака и свеже масе корена и индекса толерантности корена на стрес; дужине корена и стопе издуживања корена и вигор индекса; свеже масе надземног дела и суве масе надземног дела изданака и индекса стабилности мембране; свеже масе корена и индекса толерантности корена на стрес; суве масе корена и стопе издуживања корена и пропустљивости електролита; стопе издуживања корена и пропустљивости електролита и индекса толерантности корена на сушу; вигор индекса и индекса толерантности корена на сушу. С друге стране, значајна негативна корелација је утврђена између свеже масе надземног дела изданака и пропустљивости електролита; суве масе корена и индекса стабилности мембране; стопе издуживања корена и индекса стабилности мембране, као и између индекса стабилности мембране и пропустљивости електролита (Слика 22, А).

У стресним условима суше, утврђена је високо значајна корелација између енергије клијања и клијавости семена, свеже и суве масе корена и индекса толерантности на сушу; дужине надземног дела изданака и дужине корена, стопе издуживања надземног дела изданака, стопе издуживања корена, вигор индекса, релативног садржаја воде, индекса толерантности надземног дела изданака на стрес и индекса толерантности корена изданака на стрес; дужине корена изданака и свеже и суве масе корена, стопе издуживања надземног дела изданака и стопе издуживања корена изданака, вигор индекса, индекса толерантности на сушу, индекса толерантности надземног дела изданака на стрес и индекса толерантности корена изданака на стрес; свеже масе надземног дела изданака и индекса толерантности корена на стрес; суве масе надземног дела изданака и вигор индекса, индекса толерантности надземног дела изданака на стрес и индекса толерантности корена изданака на стрес; суве масе корена и индекса толерантности на сушу; стопе издуживања надземног дела изданака и стопе издуживања корена, вигор индекса, релативног садржаја воде, индекса толерантности надземног дела изданака на стрес и индекса толерантности корена изданака

на стрес; стопе издуживања корена и вигор индекса, индекса толерантности надземног дела изданака на стрес и индекса толерантности корена изданка на стрес; вигор индекса и индекса толерантности надземног дела изданака на стрес и индекса толерантности корена изданка на стрес, као и индекса толерантности надземног дела изданака на стрес и индекса толерантности корена изданка на стрес (Слика 22, Б). Негативна корелација утврђена је између стопе издуживања надземног дела изданака и односа корен/надземни део, али и индекса стабилности мембране и пропустљивости електролита (Слика 22, Б).

А) Оптимални услови																			
	ЕК	КЛ	АТ	ДНД	ДК	СВН	СВК	СУН	СУК	СИН	СИК	ВИ	ИСМ	ПЕ	РСВ	ИТС	ОКН	ИТН	ИТК
ЕК	1,000	0,272	-0,186	0,311	0,428	0,019	0,132	0,214	0,022	-0,356	0,130	0,463	-0,077	0,077	0,332	0,083	-0,713	0,335	0,381
	КЛ	1,000	-0,556	0,629	0,435	0,111	0,666	0,125	0,064	0,223	0,227	0,687	0,054	-0,054	0,124	0,317	0,006	0,608	0,466
		АТ	1,000	-0,508	-0,408	-0,223	-0,430	-0,256	0,155	0,046	-0,115	-0,557	-0,091	0,091	-0,046	-0,293	0,336	-0,377	-0,472
			ДНД	1,000	0,222	0,656	0,864	0,668	-0,269	0,353	-0,106	0,536	0,432	-0,432	-0,402	0,581	0,089	0,915	0,240
				ДК	1,000	-0,354	0,233	-0,230	0,699	0,331	0,867	0,931	-0,693	0,693	0,575	-0,002	-0,353	0,227	0,970
					СВН	1,000	0,582	0,856	-0,741	-0,040	-0,566	-0,100	0,827	-0,827	-0,742	0,637	0,225	0,674	-0,376
						СВК	1,000	0,459	-0,150	0,366	-0,028	0,522	0,419	-0,419	-0,380	0,463	0,313	0,856	0,232
							СУН	1,000	-0,670	-0,044	-0,482	0,001	0,629	-0,629	-0,623	0,688	0,079	0,652	-0,246
								СУК	1,000	0,504	0,874	0,501	-0,888	0,888	0,688	-0,450	-0,044	-0,232	0,657
									СИН	1,000	0,453	0,390	-0,286	0,286	-0,136	0,112	0,595	0,294	0,345
										СИК	1,000	0,706	-0,837	0,837	0,618	-0,225	-0,107	-0,090	0,829
											ВИ	1,000	-0,436	0,436	0,382	0,199	-0,257	0,516	0,918
												ИСМ	1,000	-1,000	-0,746	0,380	0,263	0,419	-0,673
													ПЕ	1,000	0,746	-0,380	-0,263	-0,419	0,673
														РСВ	1,000	-0,324	-0,574	-0,364	0,570
															ИТС	1,000	0,105	0,476	0,099
																ОКН	1,000	0,112	-0,347
																	ИТН	1,000	0,159
																		ИТК	1,000

Б) Суша																			
	ЕК	КЛ	АТ	ДНД	ДК	СВН	СВК	СУН	СУК	СИН	СИК	ВИ	ИСМ	ПЕ	РСВ	ИТС	ОКН	ИТН	ИТК
ЕК	1,000	0,804	-0,620	0,488	0,569	0,395	0,823	0,644	0,847	0,182	0,422	0,638	0,582	-0,582	0,344	0,841	0,163	0,494	0,561
	КЛ	1,000	-0,620	0,547	0,579	0,344	0,678	0,579	0,729	0,327	0,483	0,706	0,505	-0,505	0,346	0,715	0,018	0,534	0,546
		АТ	1,000	-0,577	-0,519	-0,221	-0,363	-0,351	-0,510	-0,547	-0,523	-0,599	-0,320	0,320	-0,608	-0,509	0,268	-0,591	-0,519
			ДНД	1,000	0,946	0,703	0,103	0,779	0,595	0,921	0,950	0,949	-0,014	0,014	0,809	0,744	-0,682	0,994	0,903
				ДК	1,000	0,798	0,211	0,873	0,610	0,833	0,971	0,983	-0,059	0,059	0,704	0,800	-0,632	0,941	0,962
					СВН	1,000	0,070	0,780	0,412	0,584	0,752	0,744	-0,259	0,259	0,323	0,619	-0,580	0,707	0,817
						СВК	1,000	0,431	0,682	-0,187	0,053	0,295	0,744	-0,744	-0,002	0,628	0,507	0,102	0,195
							СУН	1,000	0,681	0,565	0,789	0,859	0,098	-0,098	0,457	0,900	-0,384	0,771	0,832
								СУК	1,000	0,298	0,488	0,666	0,498	-0,498	0,465	0,916	0,088	0,577	0,565
									СИН	1,000	0,916	0,818	-0,191	0,191	0,807	0,461	-0,835	0,916	0,797
										СИК	1,000	0,947	-0,115	0,115	0,723	0,688	-0,716	0,947	0,933
											ВИ	1,000	0,050	-0,050	0,710	0,825	-0,571	0,943	0,943
												ИСМ	1,000	-1,000	-0,050	0,345	0,660	-0,019	-0,064
													ПЕ	1,000	0,050	-0,345	-0,660	0,019	0,064
														РСВ	1,000	0,502	-0,625	0,789	0,615
															ИТС	1,000	-0,138	0,741	0,763
																ОКН	1,000	-0,680	-0,604
																	ИТН	1,000	0,925
																		ИТК	1,000

Слика 22. Топлотна мапа заснована на корелационој анализи испитиваних параметара повртарског грашка. А) Оптимални услови; Б) Суша

Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације су показали да полисахариди пореклом из гљиве *S. commune* Fr. гајене у потопљеној култури подстичу енергију клијања и клијавост семена грашка, као и да повољно утичу на почетни пораст и развој биљака, како у оптималним, тако и у стресним условима суше. Битно је напоменути да су у питању пионирски резултати, с обзиром да не постоје доступни литературни подаци о примени полисахарида пореклом из ове гљиве у биопрајмингу семена. Наиме, биопрајминг семена грашка и других усева углавном укључује примену различитих биоинокуланата попут екстраката биљака, корисних микроорганизама (бактерије, алге, гљиве и др.) или биолошких производа (хитозан, хуминска киселина и др.) с обзиром да је утврђено да утичу на развој специјализованих карактеристика за борбу против негативних последица абиотичког стреса и да повећавају приносусева (Chakraborti *u cap.*, 2022). Примера ради, енергија клијања семена грашка након биопрајминга са екстрактом рогоза (*Typha angustifolia*) у стресним условима (салинитет) је повећана за 15,00% (Ghezal *u cap.*, 2016), док су резултати добијени у оквиру овог рада указали на повећање енергије клијања након биопрајминга полисахаридима (ИПСХ ИТА) за 31,50% у условима суше. Биопрајминг полисахаридима изолованим из цијанобактерије *Chlorella vulgaris* је утицао значајно на побољшање клијавости и повећање параметара почетног пораста биљака код пшенице и пасуља (Dalal *u cap.*, 2021), док је третман ЕПСХ изолованог из ризобактерије значајно стимулисао клијавост, пораст и принос пшенице (Prasad *u cap.*, 2022).

Са друге стране, прајминг повртарског грашка калцијум-хлоридом (осмопрајминг) и салицилном киселином (хормопрајминг) значајно је утицао на све анализиране параметре клијавости и почетног пораста биљака, осим на удео атипичних изданака, и у оптималним и у стресним условима (топлотни стрес) (Tamindžić *u cap.*, 2023). У поређењу са ЕПСХ и ИПСХ изолованим из потопљене културе гљиве *S. commune* Fr., енергија клијања у оптималним условима након хормо- и осмопрајминга је повећана за 0,10 до 7,00%, респективно у просеку, односно у условима топлотног стреса за 2,30 до 14,30% (Tamindžić *u cap.*, 2023). Даље, Miljaković *u cap.* (2022) су показали да биопрајминг семена грашка бактеријама *B. japonicum* и *B. megaterium* значајно утиче на повећање квалитета семена као и на побољшан раст биљке. Већа дужина корена и надземног дела у односу на контролу

може бити последица повећаних деоба у апикалном меристему, што је узроковало повећање почетног пораста, као што је то случај након биопрајминга семена грашка са екстрактом рогоза (Ghezal *u cap.*, 2016). Истраживања Shaffique *u cap.* (2023) су показала позитиван утицај биопрајминга са бактеријским сојем сличним *Klebsiella spp.* који производи егзополисахаридни матрикс на клијавост и вигор семена и продукцију биомасе пшенице у условима суше, што је у сагласности са добијеним резултатима ове докторске дисертације. Такође, биопрајминг семена грашка *Trichoderma asperellum* је утицао на повећање дужине надземног дела изданака, дужину корена и свежу масу корена и надземног дела изданака у оптималним условима (Singh *u cap.*, 2016). Надаље, Chandra Nayaka *u cap.* (2010) су у својим истраживањима указали на позитиван ефекат биопрајминга семена кукуруза са *Trichoderma harzianum* на клијавост и вигор индекс, што је у сагласности са добијеним резултатима. Ghezal *u cap.* (2016) већу стопу клијања семена и уједначеност у ницању приписују метаболичкој репарацији током имбибиције, као и нагомилавању секундарних метаболита који повећавају клијавост. Наиме, клијање семена, као есенцијална фаза за раст, развој и успешно заснивање усева, је угрожено у условима суше услед слабије активације неопходних хидролитичких ензима за разградњу скроба, солубилизацију и транспорта угљних хидрата, што доводи до смањења вигора и индекса клијања (Saha *u cap.*, 2022).

Познато је да прајминг поправља оштећења настала услед старења семена и излагања абиотичким стресовима (Ghezal *u cap.*, 2016). Биостимулативни ефекат на клијавост и параметре почетног пораста од стране изолованих ЕПСХ и ИПСХ највероватније се може приписати способности полисахарида да зауставе губитак воде, с обзиром да је показано да полисахариди цијанобактерије (*Chlorella vulgaris*) ублажавају осмотске поремећаје семена и обезбеђују високу влагу за клијање (Vázquez *u cap.*, 1998; Dalal *u cap.*, 2021). Такође, с обзиром на позитивну корелацију између енергије клијања и параметара почетног пораста у условима суше може се закључити да биопрајминг полисахаридима изолованим из *S. commune* Fr. може бити кључан како за рану фазу развоја (клијање), тако и за повећање биомасе и приноса у каснијим фазама развоја грашка. Штавише, повећање толерантности повртарског грашка на сушу и побољшање клијавости семена у условима суше може се приписати стимулаторним ефектима биопрајминга који

подстичу раст, што је у сагласности са *Bisen u cap.* (2015). Штавише, приказани резултати јасно указују на значај биопрајминга у одржавању и побољшању физиолошких параметара као што су стабилност мембране и релативан садржај воде у условима водног дефицита. Наиме, у фази клијања и ницања, суша утиче на морфолошке (дужина и биомаса изданака), физиолошке (садржај воде у изданцима), биохемијске (активности амилазе, протеазе и липазе) и молекуларне (протеини стреса, аквапорини и дехидрини) карактеристике, што доводи до смањења у укупном порасту изданака (*Yigit u cap.*, 2016). С тим у вези, прајминг има круцијалну функцију у побољшању клијања и пораста биљака, кроз активацију бројних гена који реагују на стрес, регулацију протеина и гена укључених у деобу ћелија, модификацију цитоскелета, експресију РНК, мобилизацију резервних материја, одговор на оксидативни стрес и транспортере воде, као и поправку ДНК и мембране (*Rajjou u cap.*, 2012; *Bewley u cap.*, 2013; *Kubala u cap.*, 2015; *Saha u cap.*, 2022). Наиме, филтрати цијанобактерије су стимулисали синтезу биоактивних једињења, укључујући цитокинин, ауксин и гиберелин, који представљају регулаторе раста биљака, у проклијалим семенима пшенице и на тај начин утицали на повећање дужине корена и висине изданка (*Stirk u cap.*, 1999; *Dalal u cap.*, 2021). Додатно, биопрајминг семена пшенице *Trichoderma harzianum* у условима суше се показао као врло ефикасан у побољшању индекса стабилности мембране и релативног садржаја воде (*Shukla u cap.*, 2015), што је у сагласности са резултатима ове дисертације. *Wougemani u cap.* (2023), у својим истраживањима, наводе да суша доводи до значајне редукције релативног садржаја воде, чиме се повећава температура листа, што резултира денатурацијом протеина и ензима, чиме се мења стабилност мембране и узрокује неравнотежа у ћелијским метаболитима. Стога, ова група аутора је испитивала третмане са PGPR у циљу ублажавања штетних ефеката суше и дошли су до закључка да ови третмани повољно утичу на релативан садржај воде и стабилност мембрана, али наводе да механизми још увек нису разјашњени, услед чега би требало продубити истраживања на ћелијском и молекуларском нивоу.

5.10. Детерминација антиоксидативне активности екстракта грашка

5.10.1. Детерминација ензимске активности

Улога полисахарида, изолованих из потопљене културе два соја гљиве, у борби против оксидативног стреса процењена је испитивањем активности пирогалол пероксидазе (pPx), гвајакол пероксидазе (gPx), аскорбат пероксидазе (aPx) и каталазе (CAT) у свежим екстрактима грашка (Табела 11) (Прилог 8.7., Табела 8.37. – 8.40.).

Водни дефицит је условио значајно повећање активности свих испитиваних ензима за детоксикацију реактивних кисеоничних врста у контроли, с обзиром да је активност pPx, gPx, aPx и CAT у односу на оптималне услове повећана за 91,00, 38,00, 36,00 и 44,00%, респективно. Ово указује да биљка производи више антиоксидативних ензима у условима суше како би уклонила додатне ROS у ћелијама и тако смањила ефекат суше, што поткрепљују и доступни литературни подаци. Наиме, толеранција одређених генотипова на сушу, укључујући грашак, пшеницу и пасуљ, је повезана са већом активношћу антиоксидативних ензима (Lum *u cap.*, 2014; Piri *u cap.*, 2019). Са друге стране, у оптималним условима, али и у условима стреса суше третмани полисахаридима су такође утицали на повећање активности свих испитиваних ензима. Најјачи позитиван ефекат на активност ензима у оптималним и стресним условима су имали ЕПСХ изоловани из оба соја. Конкретније, ЕПСХ СРБ је утицао на повећање активности pPx и gPx, док је ЕПСХ изолован из ИТА соја повећао активност aPx и CAT (Табела 11). Међутим, екстракт ЕПСХ СРБ није утицао на повећање активности aPx и CAT код грашка, што је највероватније последица његовог великог утицаја на јачину активности pPx и gPx. Наиме, ЕПСХ СРБ је довео до 177 пута веће активности pPx у односу на контролу у оптималним условима, односно 12 пута у сушним условима (Табела 11). Са друге стране, ЕПСХ пореклом из ИТА соја је утицао на двоструко повећање активности aPx и CAT у оптималним условима, док је у суши активност поменутих ензима повећана 1,5, односно 3 пута. Резултати су у сагласности са доступним литературним подацима који указују да биопрајминг позитивно утиче на повећање активности испитиваних ензима (Piri *u cap.*, 2019; AbdelLatif *u cap.*,

2019). Биопрајминг суспензијом *T. harzianum* је утицао на повећање активности САТ код кима (Piri *u cap.*, 2019), док је биопрајминг екстрактом квасца и екстрактом корена шаргарепе повећао ниво САТ и аРх и последично побољшао толеранцију кукуруза на сони стрес (Abdel Latef *u cap.*, 2019). Штавише, третман β -гlukanом изолованог из плодног тела гљиве *Lentinula edodes* је показао повећану активност гlukanазе и пероксидазе код парадајза изложеном биотичком стресу (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) (Melo *u cap.*, 2020).

Кроз еволуцију биљке су развиле антиоксидативни одбрамбени систем, који укључује антиоксидативне ензиме као што су пероксидаза и каталаза, како би се заштитиле од оксидативног оштећења изазваног реактивним кисеоничним врстама (Sapre *u cap.*, 2021). Карактеристика ROS-а је да њихова акумулација изазива оксидативни стрес, односно оксидативно оштећење протеина, ДНК и липида, због чега је баланс између њиховог стварања и уклањања веома важан (Gill и Tuteja, 2010). Као последица тога, равнотежа активности пероксидазе и каталазе је кључна за супресију токсичног нивоа водоник-пероксида (H_2O_2) у ћелији, с обзиром да ови ензими представљају главне механизме за уклањање ове врсте ROS-а (Sofa *u cap.*, 2015). Наиме, H_2O_2 представља један од најважнијих релативно стабилних нерадикалских ROS-а чија је повећана продукција забележена током излагања биљака абиотичком стресу, укључујући и сушу, док у нормалним физиолошким условима представља нуспроизвод многих метаболичких путева и стога се континуирано синтетише у различитим деловима ћелије (Sofa *u cap.*, 2015). Узимајући у обзир кључну улогу САТ и пероксидаза у фотореспирацији, повећање активности ових ензима у листовима биљака изложеним условима суше је највероватније довело до повећаног уклањања фотореспираторног H_2O_2 , произведеног услед дефицита воде. Штавише, добијени резултати су у сагласности са претходно објављеним подацима, који сугеришу да је повећана толеранција биљака изложена стресу повезана са побољшаном заштитом од оксидативног стреса због појачаног антиоксидативног система (Dawood *u cap.*, 2013; Lum *u cap.*, 2014; Abdel Latef *u cap.*, 2019; Piri *u cap.*, 2019).

Табела 11. Ензимска активност испитиваних екстраката грашка након третмана полисахаридима гљива

Третман	Активност рРх* ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-2}$)	Активност гРх ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-2}$)	Активност аРх ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-2}$)	Активност САТ ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-2}$)
Оптимални услови				
К	0,21	0,08	11,53	1,32
ХП	2,02	0,12	19,88	1,41
ЕПСХ ИТА	4,90	0,11	26,30	3,52
ИПСХ ИТА	2,28	0,07	13,29	1,74
ЕПСХ СРБ	37,28	0,50	9,58	1,86
ИПСХ СРБ	28,69	0,29	10,05	2,64
Суша				
К	2,28	0,13	17,92	2,35
ХП	2,02	0,07	12,18	2,26
ЕПСХ ИТА	3,56	0,51	25,75	7,17
ИПСХ ИТА	2,30	0,04	22,37	4,40
ЕПСХ СРБ	28,32	0,59	8,15	3,09
ИПСХ СРБ	24,10	0,33	9,60	1,70

*рРх – пирогалог пероксидаза; гРх– гвајакол пероксидаза; аРх– аскорбат пероксидаза; САТ – каталаза.

5.10.2. Детерминација неензимске активности

5.10.2.1. Детерминација капацитета „хватања“ DPPH и ABTS радикала и FRAP анализа

Антиоксидативна активност МЕ екстраката грашка испитана је и утврђивањем способности екстраката да неутралишу DPPH и ABTS радикале у циљу испитивања утицаја биопрајминга полисахаридима гљиве на скевенџер активност биљке грашка. Редукциони потенцијал екстраката грашка након биопрајминга семена полисахаридима пореклом из два различита соја гљиве *S. commune* Fr. одређен је применом FRAP теста. Екстракти корена и надземног дела биљке су засебно анализирани и резултати су приказани у Табели 12.

Најјачу скевенцер активност DPPH и ABTS радикала су показале биљке чија су семена подвргнута третману са екстрактом ИПСХ пореклом из СРБ соја гљиве *S. commune* Fr. и у оптималним и стресним условима. Поред тога, ЕПСХ СРБ је утицао на неутрализацију оба радикала и у екстрактима корена грашка и у екстрактима надземног дела. Наиме, биљка третирана овим екстрактом је у оптималним условима показала 1,7 пута већу неутрализацију ABTS радикала ($23,99 \pm 0,41$ mg ек. T/g с.м.; надземни део) у односу на контролу ($14,06 \pm 1,13$ mg ек. T/g с.м.; надземни део), док је у суши активност била 1,5 пута јача ($36,99 \pm 2,69$ mg ек. T/g с.м.; надземни део) у поређењу са контролом ($24,47 \pm 3,63$ mg ек. T/g с.м.; надземни део). У оптималним условима неутрализација DPPH радикала у изданку ($IC_{50} = 109,93 \pm 2,30$ $\mu\text{g/mL}$) је око 1,5 пута већа у односу на контролу ($IC_{50} = 168,95 \pm 4,05$ $\mu\text{g/mL}$), док је у условима суше активност надземног дела након биопрајминга са ЕПСХ СРБ 2,2 пута јача, с обзиром да је IC_{50} вредност $69,81 \pm 6,70$ $\mu\text{g/mL}$, док у контроли износи $155,28 \pm 0,81$ $\mu\text{g/mL}$. Полисахариди изоловани из ИТА соја гљиве су такође имали ефекат неутрализације поменутих радикала, али у знатно мањој мери (Табела 12). Поређењем скевенцер активности корена и надземног дела грашка, евидентно је да је антиоксидативна активност јача код надземног дела, са изузетком неутрализације ABTS радикала након биопрајминга са ЕПСХ СРБ ($33,55 \pm 0,18$ mg ек. T/g с.м.) и DPPH радикала након хидопрајминга ($IC_{50} = 74,32 \pm 29,71$ $\mu\text{g/mL}$). Ова разлика у активности се може објаснити различитим садржајем фенола и флавоноида у корену и изданку, с обзиром да надземни део углавном има већу концентрацију поменутих једињења за које је познато да утичу на антиоксидативну активност (Srećković *u cap.*, 2020).

Резултати FRAP теста показују да у оптималним условима третмани полисахаридима нису значајно утицали на редукциони потенцијал, с обзиром да је активност слична вредностима добијеним у контроли (Табела 12). Слична ситуација је забележена и у условима стреса, односно након суше. Међутим, битно је напоменути да у оба испитана услова, најјачи редукциони потенцијал су показали екстракти грашка чија су семена третирана екстрактом ИПСХ СРБ. Слаб редукциони потенцијал се може приписати примењеном растварачу, односно метанолу, с обзиром да су раније студије показале да је

70% етанол најбољи растварач за примену FRAP есеја код грашка (Xu и Chang, 2007; Hadrich *и сар.*, 2014).

Не постоје доступни литературни подаци са којима би упоредили скевенџер активност DPPH и ABTS радикала након биопрајминга грашка полисахаридима. Међутим, поређења ради, МЕ екстракт семењаче грашка је показао значајну мању неутрализацију DPPH радикала, с обзиром да је IC₅₀ вредност износила 650 ± 0,05 µg/mL (Hadrich *и сар.*, 2014), што је скоро 4 пута слабије од контроле (IC₅₀ = 168,95 ± 4,05 µg/mL), а 6 пута слабије од активности добијене након биопрајминга са ИПСХ СРБ (IC₅₀ = 109,93 ± 2,30 µg/mL). Истраживање Тапчић-Živanov *и сар.* (2020) је показало јачу неутрализацију ABTS радикала код бибера након биопрајминга са *Trichoderma spp.*, док су Lee *и сар.* (2022) указали да хидропрајминг семена купуса поспешује неутрализацију ABTS и DPPH радикала. Поменути подаци указују да и биопрајминг полисахаридима позитивно утиче на скевенџер активност, односно да помаже антиоксидативној одбрани код грашка.

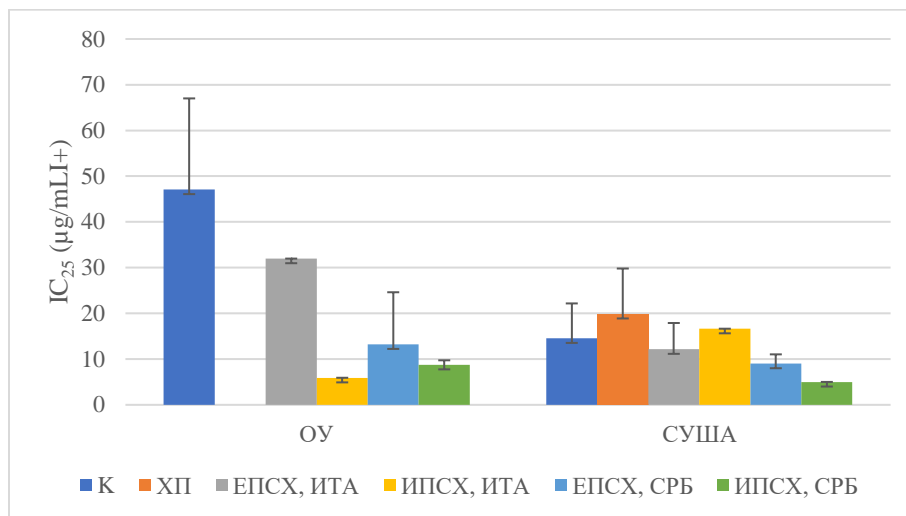
Табела 12. Упоредни преглед неутрализације DPPH и ABTS радикала и редукциони потенцијал екстраката грашка након третмана полисахаридима гљиве у оптималним условима и условима водног дефицита – суше

Третман	ABTS (mg ек. Т/g с.м.)	FRAP (mg ек. АК/g с.м.)	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)
Оптимални услови			
1. К, корен	4,09 ± 0,84 ^a	26,56 ± 3,35 ^a	319,79 ± 5,42 ^a
2. К, надземни део	14,06 ± 1,13 ^a	24,93 ± 4,49 ^a	168,95 ± 4,05 ^a
3. ХП, корен	8,68 ± 0,33 ^a	8,21 ± 0,28 ^a	74,32 ± 29,71 ^a
4. ХП, надземни део	11,01 ± 2,03 ^a	28,30 ± 1,17 ^a	382,92 ± 1,64 ^a
5. ЕПСХ, ИТА, корен	8,06 ± 0,18 ^a	10,93 ± 0,12 ^a	390,74 ± 52,76 ^a
6. ЕПСХ, ИТА, надземни део	10,86 ± 0,04 ^a	18,80 ± 0,56 ^a	211,68 ± 4,52 ^a
7. ИПСХ, ИТА, корен	3,69 ± 1,94 ^a	11,89 ± 1,41 ^a	466,03 ± 44,48 ^a
8. ИПСХ, ИТА, надземни део	16,96 ± 0,59 ^a	20,39 ± 1,23 ^a	270,63 ± 4,63 ^a
9. ЕПСХ, СРБ, корен	19,06 ± 0,61 ^a	22,36 ± 0,41 ^a	305,01 ± 9,27 ^a
10. ЕПСХ, СРБ, надземни део	21,02 ± 0,18 ^a	22,90 ± 0,32 ^a	163,95 ± 0,51 ^a
11. ИПСХ, СРБ, корен	33,55 ± 0,18 ^a	20,54 ± 0,78 ^a	144,71 ± 14,23 ^a
12. ИПСХ, СРБ, надземни део	23,99 ± 0,41 ^a	25,09 ± 0,08 ^a	109,93 ± 2,30 ^a
Суша			
1. К, корен	20,88 ± 0,26 ^a	20,71 ± 3,72 ^a	198,51 ± 1,78 ^a
2. К, надземни део	24,47 ± 3,63 ^a	25,04 ± 2,27 ^a	155,28 ± 0,81 ^a
3. ХП, корен	22,18 ± 6,08 ^a	15,89 ± 0,92 ^a	376,29 ± 25,38 ^a
4. ХП, надземни део	21,84 ± 1,25 ^a	21,54 ± 3,49 ^a	93,33 ± 2,59 ^a
5. ЕПСХ, ИТА, корен	12,90 ± 0,57 ^a	13,23 ± 0,96 ^a	235,58 ± 38,54 ^a
6. ЕПСХ, ИТА, надземни део	19,98 ± 2,11 ^a	24,32 ± 1,23 ^a	130,73 ± 10,16 ^a

7. ИПСХ, ИТА, корен	19,14 ± 4,76 ^a	14,91 ± 1,41 ^a	344,39 ± 52,00 ^a
8. ИПСХ, ИТА, надземни део	19,43 ± 0,58 ^a	23,06 ± 1,12 ^a	124,09 ± 11,06 ^a
9. ЕПСХ, СРБ, корен	19,70 ± 0,86 ^a	18,59 ± 0,23 ^a	275,12 ± 15,67 ^a
10. ЕПСХ, СРБ, надземни део	36,93 ± 1,01 ^a	21,01 ± 0,21 ^a	82,79 ± 0,01 ^a
11. ИПСХ, СРБ, корен	30,50 ± 0,56 ^a	25,96 ± 0,23 ^a	108,88 ± 7,86 ^a
12. ИПСХ, СРБ, надземни део	36,99 ± 2,69 ^a	19,24 ± 0,48 ^a	69,81 ± 6,70 ^a

5.10.2.2. Детерминација капацитета „хватања“ ОН• радикала и инхибиција липидне пероксидације

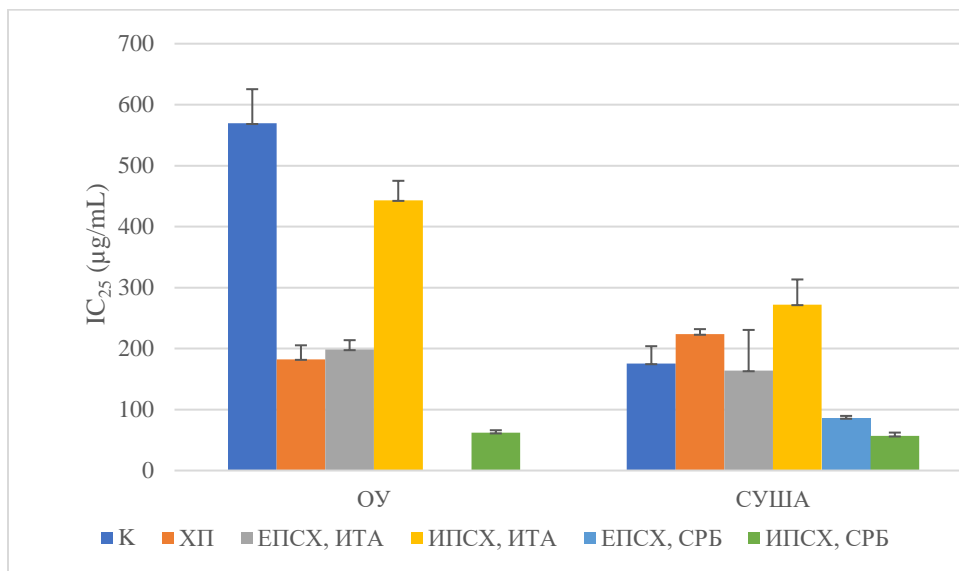
Капацитет хватања ОН радикала и инхибиција липидне пероксидације испитана је у МЕ екстрактима надземног дела грашка како би се утврдио ефекат биопрајминга полисахаридима гљиве на антиоксидативну одбрану грашка у оптималним условима и у условима стреса суше. Када је у питању неутрализација ОН радикала у оптималним условима, екстракти грашка након ХП нису показали активност, док је контрола испољила слабу активност (Хистограм 10). Са друге стране, највећи капацитет хватања ОН радикала је постигнут код екстраката грашка чија су семена третирана са ИПСХ ИТА ($IC_{25} = 5,91 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$), док је у суши највећи ефекат постигнут након биопрајминга са ИПСХ СРБ ($IC_{25} = 5,00 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) (Хистограм 10). Евидентно је да је ОН активност јача у условима стреса, што указује да се биљка у већој мери бори против слободних радикала у условима суше, што је у сагласности са претходним студијама (Sofa *u cap.*, 2015; Abdel Latef *u cap.*, 2019; Sapre *u cap.*, 2021).



Хистограм 10. Графички приказ неутрализације ОН радикала екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима изолованим из гљиве у оптималним условима и у условима водног дефицита – суше

Липидна пероксидација мембранских липида доводи до оштећења ћелијске мембране, што изазива цурење садржаја и доводи до брзог исушивања и ћелијске смрти, услед чега инхибиција овог процеса служи као поверљиви индикатор антиоксидативне одбране биљака током абиотичког стреса (Shukla *u cap.*, 2014). На Хистограму 11 јасно се може уочити да је током сушних услова повећана инхибиција липидне пероксидације код свих узорака, укључујући и контролу. Инхибиторни ефекат биопрајминга полисахаридима изолованим из ИТА соја на пероксидацију је био доста слабији у поређењу са СРБ сојем. Штавише, најјачу инхибицију је испољио екстракт грашка чије је семе третирано екстрактом ИПСХ СРБ, и у оптималним ($IC_{25} = 61,86 \pm 4,28 \mu\text{g/mL}$) и у сушним условима ($IC_{25} = 59,91 \pm 5,34 \mu\text{g/mL}$).

Резултати указују да је суша утицала на оштећење мембране што је довело до појачаног цурења електролита и липидне пероксидације у условима стреса, односно суше. Генерално, биопрајминг се показао корисним у свим случајевима, где је дошло до смањеног цурења електролита и где је појачана неутрализација слободних радикала у поређењу са нетретираним семеном тј. контролом, што је највероватније последица боље репарације мембране током поновног сушења након прајминга (Ghezal *u cap.*, 2016).



Хистограм 11. Графички приказ липидне пероксидације екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима изолованим из гљиве у оптималним условима и у условима водног дефицита – суше

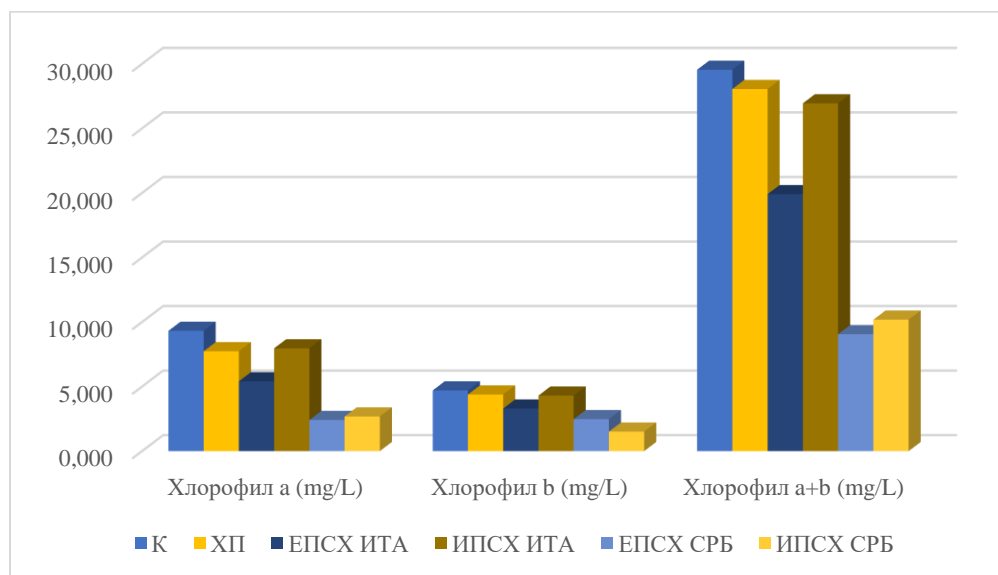
Закључно, резултати су показали да полисахариди гљиве *S. commune* Fr. подстичу клијавост и иницијални пораст биљака грашка. Свеобухватно гледано, антиоксидативна активност екстраката грашка је појачана након биопрајминга полисахаридима гљиве, са нагласком на јачи ефекат полисахарида изолованих из СРБ соја. Конкретније, екстракт ИПСХ СРБ је имао јачи ефекат на неензимску антиоксидативну активност, док је ЕПСХ СРБ испољио јачи утицај на ензимску активност. Штавише, биопрајминг је побољшао толеранцију грашка на сушу, што је највероватније последица задржавања воде услед формирања слоја биофилма од стране полисахарида пореклом из гљиве *S. commune* Fr. током биопрајминга.

5.11. Хемијска карактеризација екстраката грашка

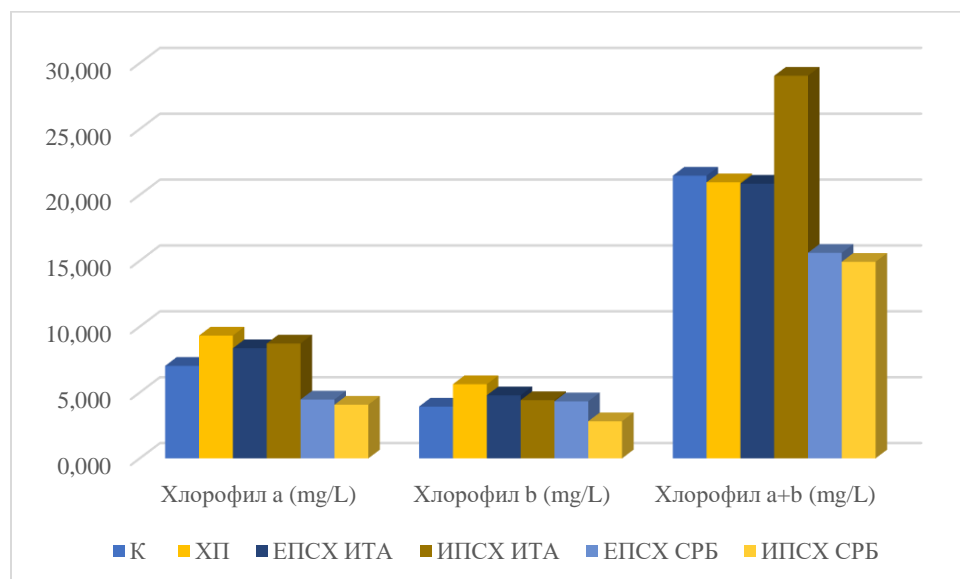
5.11.1. Детерминација укупног садржаја хлорофила грашка

У циљу процене заштитне улоге полисахарида изолованих из гљиве на фотосинтетске перформансе у оптималним и стресним условима суше, одређен је ниво

фотосинтетских пигмената хлорофила а, хлорофила б и укупног садржаја хлорофила а+б у листовима грашка (Хистограм 12 и 13). У оптималним условима биопрајминг полисахаридима није значајно утицао на повећање садржаја пигмената у листовима (Хистограм 12), што је у сагласности са резултатима добијеним у раду *Miljković и сар.* (2022) након осмо- и хормопрајминга семена соје. Међутим, водни дефицит је утицао на редуцију фотосинтетског пигмената (Хистограм 13). Штетан утицај сушних услова је највероватније довео до смањења фотосинтезе, а самим тим и до редуције садржаја хлорофила, као што је раније доказано код боба, купуса, луцерке и соје (*Siddiqui и сар.*, 2015; *Wassie и сар.*, 2019; *Moradpour и сар.*, 2021; *Miljković и сар.*, 2022). Међутим, добијени резултати указују на већу заштиту фотосинтетичких пигмената од токсичних ефеката изазваних водним дефицитом у биљкама које су третиране водом (хидропрајминг) или екстрактом полисахарида (биопрајминг) под стресом суше. Наиме, биопрајминг са ИПСХ ИТА је значајно утицао на повећање укупног садржаја хлорофила, и то за 26,12% у односу на контролу и за 27,85% у односу на хидропрајминг (Хистограм 13). Повећање броја хлоропласта у листовима или умерена количина токсичних јона у листовима који не могу да доведу до раног старења листова или разградње хлорофила могу бити извор повећања садржаја хлорофила код биљака, добијеним након биопрајминга семена (*Ghezal и сар.*, 2016). Свеобухватно гледано, ИПСХ ИТА је показала највећи утицај на садржај хлорофила а, б и на укупан садржај ових пигмената и у оптималним условима и у условима водног дефицита, док су полисахариди пореклом из СРБ соја гљиве испољили најслабији утицај на фотосинтетске перформансе листова грашка.



Хистограм 12. Графички приказ ефекта биопрајминга полисахаридима изолованих из гљиве *S. commune* Fr. на укупан садржаја хлорофила у грашку у оптималним условима



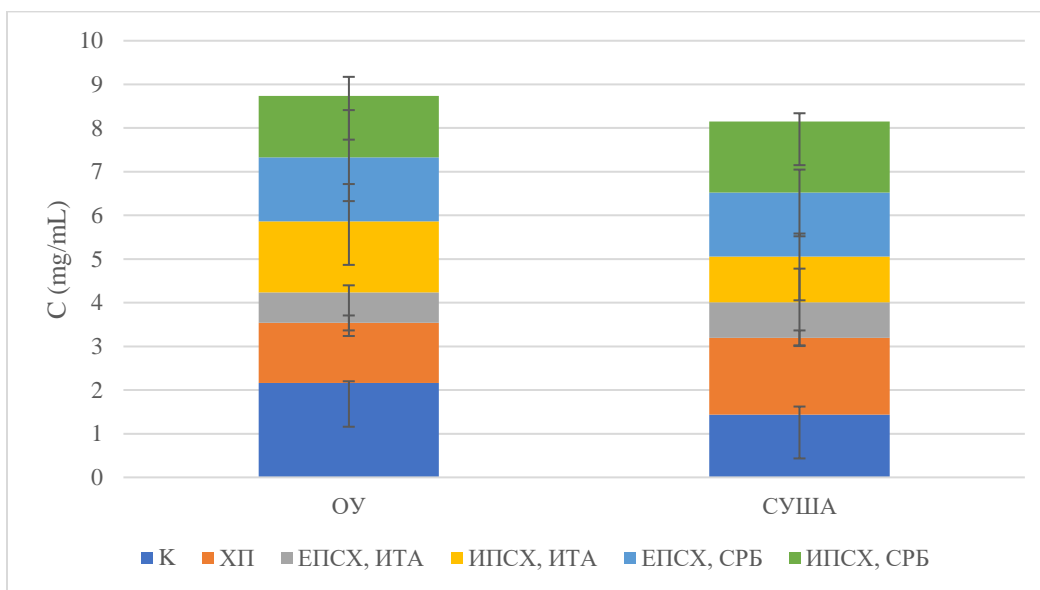
Хистограм 13. Графички приказ ефекта биопрајминга полисахаридима изолованих из гљиве *S. commune* Fr. на укупан садржаја хлорофила у грашку у условима стреса (суша)

5.11.2. Детерминација укупног садржаја протеина

Укупан садржај протеина одређен је у екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима изолованим из ИТА и СРБ соја гљиве *S. commune* Fr. у оптималним условима и условима водног дефицита. Резултати су графички приказани на Хистограму 14. Највећи садржај протеина је одређен код екстракта контроле и екстракта ИПСХ ИТА у оптималним условима ($2,16 \pm 0,44$ mg/mL и $1,63 \pm 0,16$ mg/mL, респективно). Релативно висок садржај протеина је одређен и у екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима изолованим из СРБ соја, док је најмањи садржај забележен код екстракта третираног са ЕПСХ ИТА ($0,70 \pm 0,85$ mg/mL). У сушним условима, највећа концентрација протеина забележена је код екстракта грашка након хидропрајминга ($1,76 \pm 0,53$ mg/mL) и биопрајминга са ИПСХ СРБ ($1,63 \pm 0,19$ mg/mL). Додатно, третман полисахаридима пореклом из СРБ соја у условима водног дефицита је више утицао на повећање садржаја протеина у односу на третман полисахаридима ИТА соја. Са друге стране, поређењем утицаја врсте полисахарида на укупан садржај протеина, резултати указују да је већа концентрација протеина одређена након биопрајминга са ИПСХ и у оптималним условима и у условима водног дефицита, у поређењу са ЕПСХ (Хистограм 14).

Резултати су у сагласности са резултатима Karatas *u cap.* (2014) који показују да је садржај протеина у условима суше код грашка смањен у односу на оптималне услове. Исти случај забележен је и у раду Mohammadkhani и Heidari (2008) где је анализиран састав кукуруза, као и код јечма испитаног од стране Gołębiowska-Pikania *u cap.* (2017). Поред тога, биопрајминг полисахаридима изолованим из *C. vulgaris* је значајно повећао укупан садржај протеина у екстрактима пшенице и пасуља у оптималним условима (Dalal *u cap.*, 2020). Са друге стране, Mona *u cap.* (2017) су у свом раду забележили већу концентрацију протеина код парадајза у сушним условима. Међутим, у истом раду третман семена парадајза са *T. harzianum* је позитивно деловао на садржај протеина (Mona *u cap.*, 2017), док је у овим истраживањима потврђен позитиван утицај биопрајминга са ИПСХ СРБ на количину протеина код екстракта грашка. Контрадикторност у резултатима се може објаснити чињеницом да биљка изложена сушним условима може реаговати на различите начине, зависно од дужине трајања стресних услова, степена стреса, генотипа саме биљке, као и

примењеног третмана (Al-Jebory, 2012). Наиме, као одговор на недостатак воде биљка може доживети ћелијска оштећења и метаболичке поремећаје, што може довести до деградације протеина и инхибиције синтезе протеина услед распоређивања ресурса на основне функције, попут тургора, транспорта воде и производње енергије (Al-Jebory, 2012). Излагање стресу суше доводи до акумулације ROS-а, што узрокује губитак тургора услед оштећења мембране изазваног пероксидацијом мембранских липида, што даље доводи до цурења цитоплазме (Shaffique *u cap.*, 2022). Међутим, биопрајминг побољшава одбрамбене механизме, селективну апсорпцију, стабилност мембране и толеранцију на стрес (Shaffique *u cap.*, 2022). Додатно, биопрајминг може позитивно да делује на укупан садржај протеина, што се углавном приписује активацији специфичних механизма синтезе и експресије одређених протеина (AL-Quraan *u cap.*, 2021). Штавише, третман полисахаридима је највероватније омогућио биљци да користи растворљиве полисахариде као извор угљеника и азота, као што је то био случај у раду Dalal *u cap.* (2020), услед чега је забележен већи садржај протеина у екстрактима грашка чије је семе подвргнуто биопрајмингу.

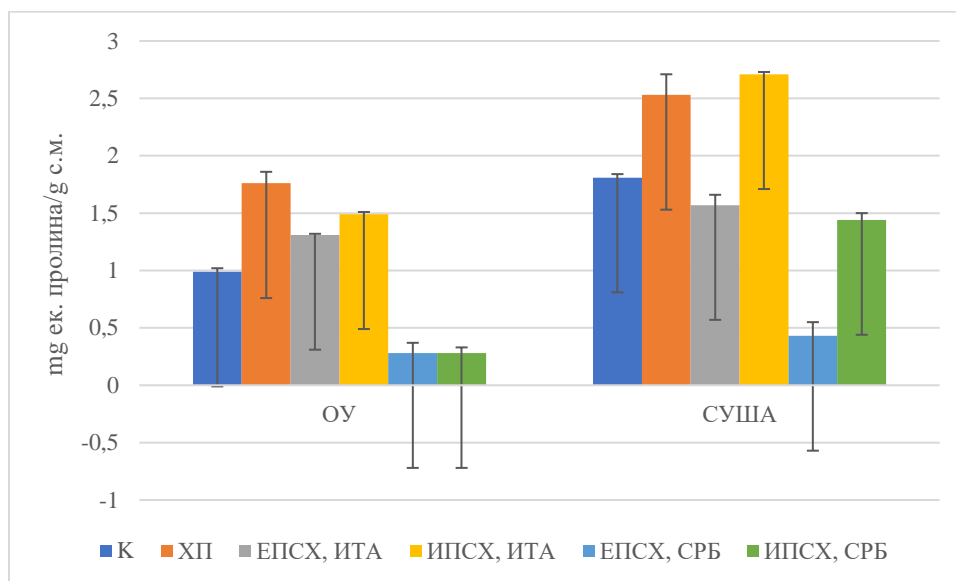


Хистограм 14. Графички приказ садржаја протеина у екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима изолованим из гљиве у оптималним условима и у условима водног дефицита – суше

5.11.3. Детерминација садржаја пролина

Брза акумулација слободног пролина у биљним ћелијама је повезана са способношћу преживљавања стресних услова (Ahmad *u cap.*, 2012), услед чега је одређен садржај пролина у екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима изолованим из гљиве *S. commune* Fr. у оптималним условима и у условима суше (Хистограм 15). У оптималним условима највећи садржај пролина забележен је након хидропрајминга ($1,76 \pm 0,10$ mg ек. пролина/g с.м.). Међутим, посматрајући утицај биопрајминга на садржај пролина у оптималним условима и у суши, највећи садржај је одређен у екстрактима третираним са ИПСХ ИТА ($1,49 \pm 0,02$ и $2,71 \pm 0,02$ mg ек. пролина/g с.м., респективно) с обзиром да је концентрација пролина била 1,5 пута већа у поређењу са контролом ($0,99 \pm 0,03$ и $1,81 \pm 0,02$ mg ек. пролина/g с.м., респективно).

Главне функције пролина укључују заштиту макромолекула од денатурације и резерви угљеника и азота у циљу ублажавања стреса, док током стреса пролин учествује у осмотском прилагођавању, осмопротекцији, неутрализацији слободних радикала и антиоксидативној активности (Ahmad *u cap.*, 2012). Утврђено је и да пролин штити метаболичке процесе у стресним условима тако што замењује воду и на тај начин доприноси стабилности важних ћелијских структура (Mona *u cap.*, 2017). Добијени резултати су у сагласности са литературним подацима који указују да је акумулација пролина у позитивној корелацији са преживљавањем стресних услова (Karatas *u cap.*, 2014; Aswani *u cap.*, 2019), с обзиром да је већи садржај пролина забележен у условима водног дефицита. Штавише, Ghezal *u cap.* (2016) су потврдили да је биопрајминг семена грашка са екстрактима листа *T. angustifolia* довео до веће акумулације пролина, чак и у односу на одговор биљке на стресне услове (салинитет), док су Mona *u cap.* (2017) указали да третман семена парадајза са *T. harzianum* позитивно утиче на акумулацију пролина у условима водног дефицита. Међутим, неки аутори доводе у питање способност пролина да директно неутралише ROS (Signorelli, 2016), док други сматрају да је он изузетно важан за одржавање редокс равнотеже у хлоропластима и митохондријама (Szabados и Savoure, 2010; Aswani *u cap.*, 2019).



Хистограм 15. Графички приказ садржаја пролина у екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима изолованим из гљиве у оптималним условима и у условима водног дефицита – суше

5.11.4. Детерминација садржаја укупних фенола и флавоноида

Укупан садржај фенола и флавоноида детерминисан је у екстрактима надземног дела и корена грашка третираним полисахаридима изолованим из ИТА и СРБ соја гљиве *S. commune* Fr.у два испитивана услова – оптимални и услови стреса (суша), а резултати су приказани у Табели 13. Резултати су показали да је највећи садржај укупних фенола одређен у екстракту корена грашка након хидропрајминга ($45,79 \pm 3,45$ mg ек. ГК/g с.м.), а највећи садржај флавоноида забележен је код екстракта корена контроле у оптималним условима ($2,21 \pm 0,11$ mg ек. К/g с.м.), док је обрнута ситуација присутна у условима суше, с обзиром да је највећа концентрација фенола и флавоноида забележена код екстраката корена и надземног дела грашка након биопрајминга са ИПСХ.

У оптималним условима, висок садржај фенола је забележен у екстрактима третираним са ИПСХ СРБ, и то већи садржај код екстракта корена ($30,41 \pm 0,35$ mg ек. ГК/g с.м.) у поређењу са екстрактом надземног дела биљке ($24,17 \pm 0,02$ mg ек. ГК/g с.м.). Биопрајминг у оптималним условима је утицао и на укупан садржај флавоноида, с обзиром

да је висока концентрација забележена након третмана екстракта корена са ИПСХ СРБ ($1,12 \pm 0,25$ mg ек. К/g с.м.), као и екстракта ЕПСХ ИТА надземног дела ($1,37 \pm 0,09$ mg ек. К/g с.м.). Са друге стране, у условима суше биопрајминг са ИПСХ пореклом из СРБ соја је утицао на повећање концентрације фенола у екстрактима корена за 1,8 пута ($23,28 \pm 0,50$ mg ек. ГК/g с.м.), односно за 1,5 пута у екстрактима надземног дела ($28,56 \pm 1,22$ mg ек. ГК/g с.м.), у односу на контролу (корен: $12,70 \pm 0,71$ и надземни део: $18,82 \pm 0,68$ mg ек. ГК/g с.м., респективно). Највећи садржај флавоноида у условима стреса суше забележен је након третмана са ИПСХ пореклом из ИТА соја (корен: $1,02 \pm 0,03$ mg ек. К/g с.м. и надземни део: $2,09 \pm 0,34$ mg ек. К/g с.м.). Сумарно, у оба испитивана услова већи садржај фенола и флавоноида је забележен у екстрактима надземног дела у поређењу са екстрактима корена, док је биопрајминг са ИПСХ највише утицао на повећање садржаја фенола и флавоноида. Третман са ИПСХ СРБ се показао као најделотворнији за повећање укупне концентрације фенола у оба испитивана услова, као и флавоноида у оптималним условима, док је третман са ИПСХ ИТА највише утицао на повећање садржаја флавоноида у условима стреса (суше).

Повећана акумулација укупних фенола и флавоноида забележена је као одговор на биопрајминг у оба испитана услова, што је у сагласности са истраживањем Ghezal *u cap.* (2016), где је биопрајминг семена грашка екстрактима *T. angustifolia* позитивно утицао на укупан садржај поменутих једињења. Dalal *u cap.* (2020) су доказали да биопрајминг семена пшенице и пасуља полисахаридима изолованим из *C. vulgaris* стимулише већу акумулацију укупних фенола. Додатно, резултати Zheng и Shetty (2000) су указали на повезаност стимулације почетног пораста грашка и повећаног укупног садржаја фенола након третмана семена сакстрактима *Trichoderma*, што је у сагласности са резултатима ове докторске дисертације. Ово даље указује да повећани садржај фенола може допринети одговору вигора семена стимулишући антиоксидативну активност.

Са друге стране, поједини литературни подаци указују да је већи садржај фенола и флавоноида присутан у стресним условима, с обзиром да биљка у стању стреса прозводи већу концентрацију ових једињења услед већег оксидативног стреса (Ahmad *u cap.*, 2012), што није случај када су у питању одређени екстракти анализирани у оквиру овог истраживања (Табела 13). Међутим, добијени резултати су у сагласности са резултатима

добијеним у раду Мона и сар. (2017), где је садржај фенола и флавоноида редукован у условима суше, док је третман семена парадајза са *T. harzianum* утицао на повећану акумулацију ових једињења. Штавише, повећана синтеза фенола и флавоноида након третмана полисахаридима пореклом из СРБ соја довела је до побољшаног почетног пораста грашка у сушним условима и на тај начин утицала на заштиту биљке од оксидативног стреса елиминацијом ROS-а. Ово потврђује позитивну улогу биопрајминга полисахаридима гљиве као окидача заштитних метаболичких путева у условима стреса суше код грашка. Већа акумулација укупних фенола и флавоноида у оптималним условима код екстраката контроле и хидропрајминга, у поређењу са условима стреса суше, може се објаснити и чињеницом да на укупан садржај фенолних једињења може утицати тип растварача, начин екстракције, али и врста екстракта (корен, надземни део, омотач семена и сл.) (Wu и сар., 2023). Поред тога, утврђено је да варијација укупног садржаја фенола и флавоноида у екстрактима грашка последица различитих генотипова, односно различите боје и облика омотача семена, с обзиром да је утврђено да удубљени и округли омотачи семена, као и тамно обојено семе, поседују већи укупни садржај полифенолних једињења (Wu и сар., 2023).

Табела 13. Укупан садржај фенола и флавоноида у екстрактима грашка након биопрајминга семена грашка са полисахаридима гљиве у оптималним условима и условима стреса (суша)

Третман	Укупни феноли (mg ек. ГК/g с.м.)	Укупни флавоноиди (mg ек. К/g с.м.)
Оптимални услови		
1. К, корен	21,47 ± 3,75	2,21 ± 0,11
2. К, надземни део	20,69 ± 2,82	1,40 ± 0,26
3. ХП, корен	45,79 ± 3,45	0,12 ± 0,05
4. ХП, надземни део	25,09 ± 0,88	1,11 ± 0,12
5. ЕПСХ, ИТА, корен	20,65 ± 1,20	0,55 ± 0,05
6. ЕПСХ, ИТА, надземни део	18,20 ± 1,18	1,37 ± 0,09
7. ИПСХ, ИТА, корен	12,05 ± 1,55	0,17 ± 0,06
8. ИПСХ, ИТА, надземни део	17,13 ± 1,13	1,15 ± 0,33
9. ЕПСХ, СРБ, корен	10,82 ± 0,26	0,54 ± 0,00
10. ЕПСХ, СРБ, надземни део	18,60 ± 0,84	0,85 ± 0,00
11. ИПСХ, СРБ, корен	30,41 ± 0,35	1,12 ± 0,25
12. ИПСХ, СРБ, надземни део	24,17 ± 0,02	0,82 ± 0,19
Суша		
1. К, корен	12,70 ± 0,71	0,73 ± 0,17
2. К, надземни део	18,82 ± 0,68	1,32 ± 0,13
3. ХП, корен	11,36 ± 0,76	0,74 ± 0,05
4. ХП, надземни део	17,43 ± 0,85	0,11 ± 0,01
5. ЕПСХ, ИТА, корен	8,55 ± 0,33	0,30 ± 0,04

6. ЕПСХ, ИТА, надземни део	14,94 ± 0,39	1,90 ± 0,52
7. ИПСХ, ИТА, корен	10,13 ± 0,18	1,02 ± 0,03
8. ИПСХ, ИТА, надземни део	16,06 ± 1,41	2,09 ± 0,34
9. ЕПСХ, СРБ, корен	15,99 ± 0,86	0,43 ± 0,09
10. ЕПСХ, СРБ, надземни део	23,03 ± 0,51	1,62 ± 0,15
11. ИПСХ, СРБ, корен	23,28 ± 0,50	0,38 ± 0,04
12. ИПСХ, СРБ, надземни део	28,56 ± 1,22	1,03 ± 0,11

Корелациона анализа је повезала анализирану ензимску и неензимску антиоксидативну активност екстраката грашка третираног полисахаридима гљиве са укупним садржајем фенола и флавоноида, као и укупним садржајем протеина и пролина. У оптималним условима, уочена је значајна позитивна корелација између активности рРх и гРх ($r^2 = 0,97$), редукционог потенцијала и укупних флавоноида ($r^2 = 0,68$), као и између неутрализације АВТS радикала и активности рРх и гРх ($r^2 = 0,75$ и $r^2 = 0,63$, респективно) (Слика 23). Позитивна корелација између укупног садржаја пролина и активности аРх, највећи садржај пролина код полисахарида пореклом из ИТА соја гљиве и највећа активност овог ензима код екстраката грашка третираних овим полисахаридима, заједно указују да је пролин игра битну улогу у ензимској активности аРх у оптималним условима. Са друге стране, у оптималним и стресним условима суше значајна негативна корелација је забележена између активности осталих пероксидаза (рРх и гРх) и садржаја пролина, као и између садржаја протеина и активности аРх и САТ (Слике 23 и 24). Додатно, у оптималним условима, садржај укупних фенола негативно корелира са неутрализацијом ОН радикалаи липидном пероксидацијом, док је позитивна корелација примећена у односу на садржај укупних флавоноида (Слика 23).

У условима стреса суше, значајна позитивна корелација је уочена између фенолног садржаја и неутрализације АВТС радикала ($r^2 = 0,91$) (Слика 24), док је у оптималним условима присутна слабија позитивна корелација ($r^2 = 0,11$). С обзиром да је у оба испитивана услова највећу неутрализацију АВТС радикала испољио екстракт грашка третиран са ИПСХ СРБ и да је највећи садржај фенола присутан управо код овог екстракта, може се закључити да је управо фенолни профил одговоран за поменућу активност. Корелациона анализа додатно указује да је за редукциони потенцијал екстраката у оптималним и стресним условима највероватније одговоран и висок садржај протеина, што је у сагласности са добијеним резултатима. Битно је напоменути и да је висока позитивна корелација у стресним условима суше забележена и између садржаја пролина и липидне пероксидације ($r = 0,86$) и ОН активности ($r = 0,76$), као и између аРх и САТ ($r = 0,81$). Закључно, корелациона анализа у оба испитивана услова указује да је за антиоксидативну активност екстраката грашка третираних полисахаридима гљива највероватније одговоран синергизам фенола, флавоноида, протеина и детектованог пролина.

	FRAP	ABTS	DPPH	УФ	УФЛАВ	УПрол	Упрот	ОН	ЛП	pPх	gPх	aPх	САТ
FRAP	1,00												
ABTS	0,33	1,00											
DPPH	-0,03	-0,55	1,00										
УФ	-0,33	0,11	-0,60	1,00									
УФЛАВ	0,68	0,03	-0,08	-0,08	1,00								
УПрол	-0,41	-0,72	0,35	0,27	-0,09	1,00							
Упрот	0,44	-0,04	-0,03	-0,11	0,27	-0,13	1,00						
ОН	0,22	0,10	-0,29	-0,10	0,11	-0,06	0,36	1,00					
ЛП	0,31	0,02	-0,08	-0,15	0,28	0,28	0,20	0,48	1,00				
pPх	0,26	0,75	-0,32	-0,16	-0,17	-0,88	-0,12	-0,14	-0,38	1,00			
gPх	0,27	0,63	-0,28	-0,16	-0,19	-0,82	-0,09	-0,13	-0,38	0,97	1,00		
aPх	-0,48	-0,49	0,18	0,24	-0,05	0,66	-0,74	-0,18	0,04	-0,53	-0,50	1,00	
САТ	-0,29	0,18	-0,02	-0,10	-0,06	-0,15	-0,84	-0,18	-0,14	0,16	0,05	0,55	1

Слика 23. Топлотна мапа базирана на корелационој анализи испитане антиоксидативне активности и хемијске карактеризације екстраката грашка – оптимални услови

	FRAP	ABTS	DPPH	УФ	УФЛАВ	УПрол	Упрот	ОН	ЛП	pPx	gPx	aPx	CAT
FRAP	1,00												
ABTS	0,37	1,00											
DPPH	-0,69	-0,57	1,00										
УФ	0,55	0,91	-0,75	1,00									
УФЛАВ	0,46	0,14	-0,46	0,19	1,00								
УПрол	-0,12	-0,42	0,28	-0,43	0,23	1,00							
Упрот	0,18	0,56	-0,11	0,50	-0,26	-0,07	1,00						
ОН	-0,23	-0,59	0,45	-0,67	0,27	0,76	-0,04	1,00					
ЛП	-0,24	-0,65	0,43	-0,69	0,37	0,86	-0,32	0,91	1,00				
pPx	0,14	0,69	-0,32	0,70	-0,24	-0,82	0,36	-0,83	-0,87	1,00			
gPx	-0,03	0,20	-0,22	0,23	-0,17	-0,90	-0,23	-0,70	-0,73	0,66	1,00		
aPx	-0,15	-0,70	0,19	-0,65	0,28	0,47	-0,88	0,39	0,61	-0,75	-0,18	1,00	
CAT	-0,27	-0,60	0,14	-0,56	0,21	0,03	-0,93	0,11	0,28	-0,36	0,35	0,81	1,00

Слика 24. Топлотна мапа базирана на корелационој анализи испитане антиоксидативне активности и хемијске карактеризације екстракта грашка – суша

5.11.5. LC-MS/MS анализа

Од укупно 64 испитивана фенола, 17 фенолних једињења је квантификовано LC-MS/MS процедуром у анализираним МЕ екстрактима грашка након третмана полисахаридима гљива у оптималним и стресним условима суше (Табела 14), док су остала једињења била изнад границе детекције, али ниже од границе квантификације (Прилог 8.5.4., Табела 8.28.). Већа акумулација детектованих једињења у оба испитивана услова је углавном присутна код екстраката третираних полисахаридима гљиве, у односу на контролу и хидропрајминг. Детектоване су 4 фенолне киселине и 13 флавоноида (2 флавонола, 5 флавона, 3 флавонона, 1 халкон, 2 изофлавонона), што је у сагласности са претходно квантификованим фенолним једињењима у екстрактима грашка (Fahim *u cap.*, 2019, Wu *u cap.*, 2023). Поред тога, у истраживању Stanisavljević *u cap.* (2016) флавоноиди представљају најзаступљенију класу квантификованих фенолних једињења у екстрактима омотача семена грашка.

Најзаступљеније фенолно једињење био је флавоноид ликиритигенин, детектован у количини од 61,92 ng/mg код екстракта корена грашка третираног са ИПСХ СРБ у оптималним условима, док је у сушним условима забележен највећи садржај протокатехинске киселине (60,15 ng/mg) код екстракта надземног дела грашка третираног са ЕПСХ ИТА. Изофлавонон генистеин детектован је само код екстраката третираних са ИПСХ СРБ, док су флавоноиди апи-7-О-Glc, витексин и каем-3-О-Glc детектовани само код СРБ соја у оба испитана услова. Карбоксилна киселина, односно р-кумаринска киселина и флавоноид нарингенин су детектовани у свим испитиваним узорцима, али је већи садржај ових једињења присутан у оптималним условима. Исти тренд је уочен поређењем садржаја р-кумаринске киселине и нарингенина у односу на сој гљиве (СРБ/ИТА) којим је биљка третирана, с обзиром да су екстракти грашка након биопрајминга семена полисахаридима пореклом из СРБ соја богатији поменути једињењима у оба испитивана услова. Наиме, укупан садржај р-кумаринске киселине у оптималним условима код ИТА соја износи 64 ng/mg, док је код СРБ соја забележен дуго већи садржај (122,31 ng/mg). Садржај нарингенина у оптималним условима код ИТА соја износи 11,56 ng/mg, а код СРБ соја 13,76 ng/mg, док је у условима суше сличан количини детектованој у оптималним условима (ИТА,

9,35 ng/mg; СРБ, 11,72 ng/mg). Супротно томе, садржај р-кумаринске киселине је у сушним условима редукован за скоро 50% код оба соја (ИТА, 39,31 ng/mg; СРБ 75,5 ng/mg).

Секундарни метаболити играју главну улогу у адаптацији биљака на услове животне средине и заобилажење стресних услова, услед чега биљка акумулира различита једињења (Ghezal *u cap.*, 2016). С тим у вези, различита акумулација фенолних једињења је последица различитог типа анализираних екстраката (корен, надземни део), различитог третмана (биопрајминга), као и услова у којима је биљка расла, с обзиром да су различити садржаји присутни у оптималним и сушним условима, што је случај и код резултата укупног садржаја фенола и флавоноида. Добијени резултати су у сагласности и са истраживањем Ghezal *u cap.* (2016), где је прајминг семена грашка воденим екстрактима листова *T. angustifolia* стимулисао различиту продукцију секундарних метаболита, укључујући полифеноле и флавоноиде, у оптималним и стресним условима (салинитет).

Квантитативну и квалитативну варијабилност у хемијском саставу екстраката поткрепљује и чињеница да су различито третирану екстракти грашка показали другачији степен испитане ензимске и неензимске антиоксидативне активности, што указује да су управо секундарни метаболити највероватније одговорни за испитане активности. Наиме, познато је да су катехини, флаволи и флавоноли главни антиоксиданси код грашка и да количина фенолних једињења високо корелира са неутрализацијом слободних радикала (Fahim *u cap.*, 2019, Nazi *u cap.*, 2020).

Резултати указују да су за ензимску активност највероватније одговорне фенолне киселине, с обзиром да је најбољу ензимску активност (САТ и аРх) показао екстракт биљке третиран са ЕПСХ ИТА, код којег је детектована већа количина протокатехинске киселине. Штавише, претходна истраживања показују да протокатехинска киселина је веома ефикасна у превенцији оксидативног стреса и да подстиче активност САТ и аРх (Guan *u cap.*, 2006; Xuan и Khang, 2018) Супротно томе, за јаку неутрализацију испитиваних слободних радикала и редукциони потенцијал од стране екстраката грашка третираних полисахаридима СРБ соја, поготово ИПСХ, највероватније главну улогу имају детектовани флаволи, изофлаволи, флавоноли и флавоноиди, чији је садржај најзаступљенији код поменутих екстраката. Конкретније, за инхибицију липидне пероксидације, неутрализацију

ABTS и ОН радикала, као и за редукциони потенцијал екстраката грашка подвргнутих биопрајмингу са ИПСХ СРБ највећу улогу су одиграли флавоноид нарингенин и његов гликозид нарингин. Ове резултате поткрепљује и истраживање Cavia-Saiz *u cap.* (2010), где је доказана активност ових једињења против ABTS и ОН радикала, као и инхибиција липидне пероксидације, док је помоћу FRAP методе потврђена редукциона способност. Stanisavljević *u cap.* (2016) су уочили значајну позитивну корелацију између садржаја нарингенина код грашка и неутрализације DPPH активности, док је са друге стране, потврђена и анти-DPPH активност ликиритигенина (Yu *u cap.*, 2015), најзаступљенијег флавонона у екстракту грашка третираног са ИПСХ СРБ.

У циљу додатног повезивања антиоксидативне активности екстраката грашка са квантификованим фенолним једињењима, као и графичког представљања утицаја биопрајминга полисахаридима гљива на одбрамбени систем биљке у оптималним условима и у условима стреса суше, урађена је статистичка анализа главних. Добијени резултати су у сагласности са резултатима антиоксидативне активности за оптималне услове испитиване у оквиру ове докторске дисертације. Битно је напоменути да је ово први извештај РСА анализе спроведене између фенолних једињења и антиоксидативне активности екстраката грашка након биопрајминга семена полисахаридима два различита соја гљиве *S. commune* Fr.

Табела 14. Одређене концентрације одабраних фенолних једињења LC-MS/MS техником у испитиваним МЕ екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима пореклом из гљиве *S. commune* Fr. (ng/mg с.м.)

Екстракт/Једињење	Протокатехинска кис.	р-кумаринска кис.	Ферулна кис.	Апигенин	Генистеин	Нарингенин	Апи-7-О-Глс	Витексин	Каем-3-О-Глс	Аментофлавон	Апиин	Ликригитенин	Изоликригитенин	Формононетин	Диосметин	Урсолна кис	Нарингин
Оптимални услови																	
К, КО	<24,50	10,85	<12	<6	<6	3,24	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
К, НД	<24,50	10,23	17,10	<6	<6	1,63	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
ХП, КО	<24,50	10,64	<12	<6	<6	1,71	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
ХП, НД	<24,50	27,13	17,83	<6	<6	2,40	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
ЕПСХ, ИТА, КО	<24,50	7,45	<12	<6	<6	2,27	<0,75	<6	<12	48,73	<6	/	/	/	/	/	/
ЕПСХ, ИТА, НД	<24,50	24,68	21,69	<6	<6	3,05	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
ИПСХ, ИТА, КО	<24,50	7,31	<12	<6	<6	4,14	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
ИПСХ, ИТА, НД	<24,50	24,56	25,31	<6	<6	2,10	<0,75	<0,75	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
ЕПСХ, СРБ, КО	<24,50	29,02	<49	<1,5	<3	1,90	<0,75	1,03	4,40	<12	<0,75	30,71	6,81	5,57	<1,5	18,86	1,64
ЕПСХ, СРБ, НД	<24,50	30,27	<49	1,60	<3	2,17	1,00	3,45	6,22	<12	1,19	28,64	6,71	6,36	2,32	28,24	11,77

5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА И ДИСКУСИЈА

Јована Мишковић
Докторска дисертација

ИПСХ, СРБ, КО	29,75	46,66	<49	<1,5	4,49	6,26	3,18	2,73	13,09	<12	2,72	61,92	15,43	25,47	<1,5	61,68	2,06
ИПСХ, СРБ, НД	<24,50	16,36	<49	<1,5	3,06	3,43	2,77	<0,75	10,75	<12	2,46	19,78	5,96	7,54	<1,5	18,24	4,46
Суша																	
К, КО	<24,50	10,14	14,45	<6	<6	2,14	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
К, НД	<24,50	19,96	29,42	<6	<6	1,59	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
ХП, КО	<24,50	7,13	17,59	<6	<6	2,14	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
ХП, НД	<24,50	15,01	21,45	<6	<6	1,76	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
ЕПСХ, ИТА, КО	<24,50	8,22	20,97	<6	<6	2,86	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
ЕПСХ, ИТА, НД	60,15	9,19	<12	<6	<6	2,45	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
ИПСХ, ИТА, КО	<24,50	7,25	<12	<6	<6	2,49	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
ИПСХ, ИТА, НД	<24,50	14,65	17,59	<6	<6	1,55	<0,75	<6	<12	<24,50	<6	/	/	/	/	/	/
ЕПСХ, СРБ, КО	<24,50	12,68	<49	<1,5	<3	1,63	0,94	1,05	3,37	<12	1,11	20,08	3,44	4,46	<1,5	19,00	4,80
ЕПСХ, СРБ, НД	<24,50	18,85	<49	<1,5	<3	1,90	1,06	1,31	4,83	<12	1,48	19,38	4,92	3,30	<1,5	11,30	6,46
ИПСХ, СРБ, КО	<24,50	19,34	<49	<1,5	<3	3,80	3,47	2,88	10,97	<12	2,22	18,28	3,72	4,79	<1,5	18,93	4,13
ИПСХ, СРБ, НД	<24,50	24,63	<49	<1,5	3,67	3,94	2,91	2,58	10,60	<12	2,70	45,15	10,84	5,16	<1,5	58,57	3,22

*КО – корен; НД – надземни део; / - није анализирано.

5.11.6. Мултиваријациона анализа

Квантификована једињења у оптималним условима подвргнута су статистичкој РСА анализи за ензимску (График 2) и неензимску антиоксидативну активност (График 3). Матрица се састојала од 12 различитих узорака и 26 варијабли. Код ензимске активности варијабилност прве осе износи 80,70%, док је варијабилност друге 8,40%. Штавише, јасно је уочљиво груписање већине квантификованих фенолних једињења у позитивном делу прве осе, док су у негативном делу присутни само ферулна киселина и нарингин. Резултати РСА анализе указују да рРх активност екстраката грашка, чије је семе подвргнуто биопрајмингу са ЕПСХ СРБ, позитивно корелира са ферулном киселином, што је у сагласности са истраживањем Sharma *и сар.* (2015b), где је утврђено да ово једињење индукује активност пероксидазе и смањује ниво токсичног H_2O_2 код пшенице. Ензимска активност аРх и САТ је представљена у позитивном квадранту у односу на прву осу, где су груписани екстракти грашка третирани са ЕПСХ ИТА, сугеришући да су управо фенолне киселине и флавоноиди одговорни за стимулацију ових ензима (График 2). Резултати РСА анализе за неутрализацију слободних радикала показују да збирна варијабилност садржана у првој и трећој осе износи 70,6%, са највећим уделом прве осе од 69,40%. Већина квантификованих фенолних једињења, са изузетком неких флавоноида (каемферол, апиин), је смештена у негативном квадранту обе главне компоненте заједно са АВТС, FRAP и DPPH активношћу (График 3). У истом квадранту се налазе и екстракти ИПСХ СРБ, који су се показали као најделотворнији када је у питању неутрализација слободних радикала и редукциони потенцијал, сугеришући да су главну улогу у активности имали управо детектовани флавоноиди, као и фенолне киселине.

РСА анализа антиоксидативне активности у условима стреса (суше) приказана је на Графицима 4 и 5, док је укупна варијанса за ензимску активност износила 88,70%, а за неутрализацију слободних радикала и редукциони потенцијал 76,60%. Најзаступљеније фенолно једињење у сушним условима је била протокатехинска киселина, која позитивно корелира са активношћу аРх и САТ и налази се у истом квадранту са екстрактом грашка ЕПСХ ИТА, што додатно потврђује претпоставку да је управо она одговорна за антиоксидативну активност ових ензима (График 4). Такође, уочљиво је радздвајање

Јована Мишковић
Докторска дисертација

екстраката ЕПСХ и ИПСХ СРБ у позитивном квадранту у односу на обе главне компоненте. Наиме, до овог раздвајања је дошло на основу параметара ензимске активности (јака рРх активност), односно на основу већег присуства флавоноида, р-кумаринске киселине и ферулне киселине у овим узорцима, што је у сагласности са резултатима истраживања ове докторске дисертације. РСА график неензимске активности у условима суше јасно показује раздвајање анализираних фенолних једињења у односу на трећу главну компоненту (График 5). Наиме, у позитивном делу прве осе су груписани флавоноиди, укључујући и ликиритигенин, нарингенин и нарингин, указујући да они играју битну улогу у неутрализацији DPPH, ABTS и OH радикала, као и у инхибицији липидне пероксидације. Ово је у складу са претпоставкама изнетим у претходном поглављу, с обзиром да су поменута једињења доказани антиоксиданси (Cavia-Saiz *u cap.*, 2010; Yu *u cap.*, 2015). Са друге стране, у негативном делу PC1 (75,40%) издвојили су се аментофлавон, апиин, генистеин и протокатехинска киселина, указујући на позитивну корелацију ових фенолних једињења са редукционим потенцијалом. Ово груписање је у сагласности са литературним подацима и претходним истраживањима који су показали да су биљни екстракти са највећом концентрацијом аментофлавона и протокатехинске киселине имали најјачу FRAP активност (Erdogan-Orhan *u cap.*, 2011; Biskup *u cap.*, 2013).

Ове резултате поткрепљује и корелациона анализа, међутим, не треба занемарити ни чињеницу да антиоксидативни потенцијал и ниво фенолних једињења код екстраката зависи и од примењеног растварача и типа екстракције (Fahim *u cap.*, 2019). Са друге стране, познато је да су флавоноиди укључени у заштиту семена, док неки аутори наводе да секундарни метаболити, поред побољшавања клијавости семена, индукују ензиме и транспортере за детоксикацију, који узрокују инактивацију или потпуну елиминацију одређених токсина и метаболичких процеса кроз вакуоларну секвестрацију или егзоцитозу (Chon и Kim, 2002; Pedrol *u cap.*, 2006, Kumar *u cap.*, 2018). Додатно, познато је да повећање ензимске активности утиче на клијавост, као и да семе након биопрајминга испољава ранију иницијацију протеина, као и РНК и ДНК синтезу, што последично доводи до брже ћелијске активације и клијања (Ghezal *u cap.*, 2016). Ово указује на битну улогу секундарних метаболита у важним метаболичким процесима унутар биљке. Такође, синергизам може играти битну улогу када је у питању антиоксидативна активност, с обзиром на присуство пролина и протеина у узорцима грашка третираним ИПСХ пореклом из оба соја. Поред тога,

Јована Мишковић
Докторска дисертација

значајна позитивна корелација између укупног садржаја пролина и протеина и антиоксидативне активности додатно потврђује синергистички ефекат.

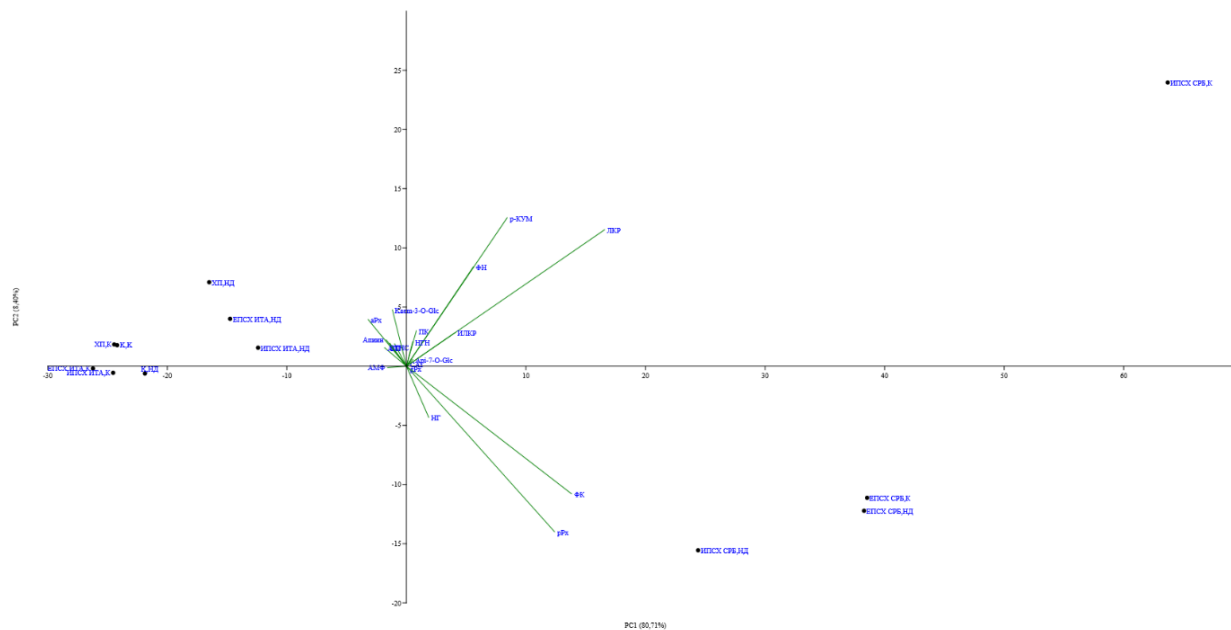


График 2. РСА анализа ензимске антиоксидативне активности и детектованих фенолних једињења у екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима гљиве у оптималним условима (АМФ – аментофлавон, АПГ – апигенин, ВТ – витексин, ГНС – генистеин, р-КУМ – р-кумаринска киселина, ИЛКР – изоликириритигенин, ЛКР – ликиритигенин, НГ – нарингин, НГН – нарингенин, ПК – протокатехинска киселина, ФН – формонетин, ФК – ферулна киселина)

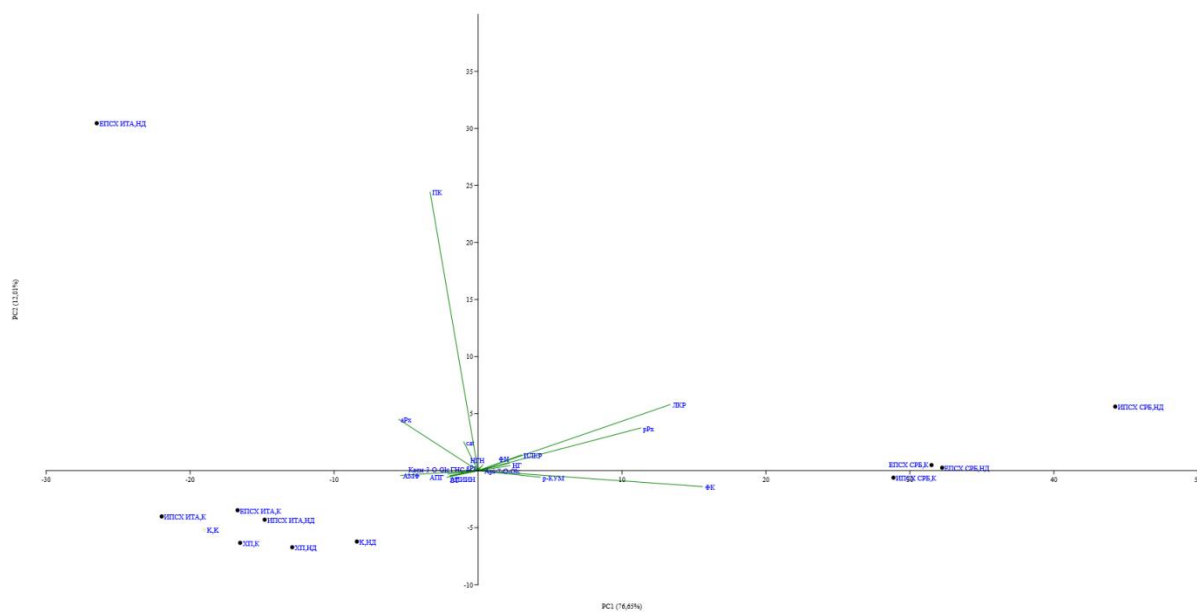


График 4. PCA анализа ензимске антиоксидативне активности и детектованих фенолних једињења у екстрактима грашка након биопрајминга полисахаридима гљиве у условима стреса (суша) (АМФ – аментофлавон, АПГ – апигенин, ВТ – витексин, ГНС – генистеин, р-КУМ – р-кумаринска киселина, ИЛКР – изоликириритигенин, ЛКР – ликиритигенин, НГ – нарингин, НГН – нарингенин, ПК – протокатехинска киселина, ФН – формононетин, ФК – ферулна киселина)

6. ЗАКЉУЧАК

Резултати докторске дисертације пружају важан увид у потенцијал коришћења полисахарида изолованих из филаментозних гљива, конкретно врсте *S. commune* Fr., у биопрајмингу семена грашка, што даље отвара пут будућим истраживањима еколошких природних формулација и евентуалној примени у одрживој пољопривредној пракси.

Први део докторске дисертације је посвећен детаљној анализи различитих екстраката гљиве са циљем одабира најпотентнијих. На основу представљених података и анализе ПСХ и ЕТ екстраката гљиве *S. commune* Fr., може се закључити да је антирадикалска активност ЕТ и ПСХ екстраката анализираних врсте гљиве показала варијације у зависности од услова инкубације, са највећом активношћу забележеном након 14 дана инкубације у потопљеној култури. Даље, ПСХ екстракти гљиве су показали највећи потенцијал инхибиције ацетилхолинестеразног ензима, надмашујући IC_{90} , док су СРБ и ИТА сојеви врсте *S. commune* Fr. показали различите активности код различитих типова екстраката (БМ и Ф). Статистичка анализа је потврдила значајне разлике између ПСХ и ЕТ узорака код СРБ соја ($p < 0,05$), што указује на то да тип растварача и начин екстракције имају директан утицај на испитиване активности. Додатно, корелациона анализа је показала позитивну везу између антиоксидативне активности и садржаја фенола, што наглашава значај фенолних једињења у овим екстрактима. Међутим, резултати су нагласили могућност синергистичког ефекта између примарних и секундарних метаболита у инхибицији ацетилхолинестеразе, али и у антиоксидативној и антибактеријској активности екстраката гљиве.

Добијени подаци су пружили детаљан увид у различите активности испитиваних екстраката гљиве и омогућили боље разумевање биохемијских својстава ЕТ и ПСХ екстраката. Штавише, резултати су указали на потенцијал коришћења поменутих екстраката у фармакологији и индустрији, и омогућили идентификацију најпотентнијих екстраката гљиве за даља истраживања у биопрајмингу.

Истраживање структуре и хемијских својстава полисахарида изолованих из различитих сојева гљива (СРБ и ИТА) је указало на додатан аспект разлике у структури и активностима између сојева и врсте полисахарида (ЕПСХ и ИПСХ). Наиме, FTIR спектри анализираних ЕПСХ и ИПСХ показали су врло сличне особине код оба испитивана соја, са

присуством ароматичних једињења и протеина. Ова сличност је подржана микроанализом која је открила присуство азота у оба екстракта, што наговештава присуство протеина или других азотом богатих полимера. Congo red тест је указао на губитак троструке хеликоидне конформације код полисахарида изолованих из ИТА соја, што подржава закључак да су у питању β -гљукани. Са друге стране, резултати Congo red теста су негирани хеликоидну структуру код узорака СРБ сојашто доприноси наводу да су ЕПСХ и ИПСХ пореклом из овог соја вероватно хетерополисахариди који егзистирају као слободни ланци. Овај закључак је подржан и резултатима NMR анализе, СЕМ микрографије, FTIR анализе, микроанализе и Bradford теста, који су открили присуство протеина и других ароматичних једињења (фенолна једињења) у овим узорцима.

Други део истраживања је био посвећен биопрајмингу семена грашка *P. sativum* L. полисахаридима (ЕПСХ и ИПСХ) изолованим из два соја (СРБ и ИТА) гљиве *S. commune* Fr. Важно је нагласити да се ови резултати сматрају пионирским, јер не постоје претходни литературни подаци о коришћењу полисахарида из ове гљиве у контексту биопрајминга семена. Резултати су показали да полисахариди из гљиве *S. commune* Fr., култивисане у потопљеној култури, позитивно доприносе енергији клијања и клијавости семена грашка, са нагласком на полисахариде изоловане из СРБ соја. Исто тако, полисахариди имају благотворан утицај на почетни пораст и развој биљака, како у оптималним условима тако и при изложености стресу изазваном сушом. Наиме, у оптималним условима екстракт ИПСХ СРБ је утицао на повећање енергије клијања за 5,50% у односу на контролу, док је највећи проценат клијавости (94,70%) показало семе након биопрајминга са полисахаридима изолованим из ИТА соја. У условима стреса (суше) сви испитивани третмани су довели до значајног повећања индекса толерантности на сушу у поређењу са контролом, а најбољи ефекат су испољили ЕПСХ ИТА (23,00%) и ЕПСХ СРБ (24,00%). Значајно побољшање испитиваних параметара, као и позитивна корелација између енергије клијања и параметара почетног пораста у условима суше указују да примена ових полисахарида може имати дугорочне користи за биљку. Штавише, биопрајминг полисахаридима изолованим из гљиве *S. commune* Fr. могао би бити од суштинског значаја за стимулисање ране фазе развоја,

односно клијања семена, као и за увећање биомасе и приноса у каснијим фазама развоја грашка.

Испитивања антиоксидативне активности као и хемијска карактеризација екстраката грашка након биопрајминга полисахаридима гљиве су значајно допринела сазнањима о утицају биопрајмингу семена на одбранбени механизам биљке у оптималним условима и условима стреса (суша). Истраживања ензимске активности су показала полисахариди допринели повећању активности различитих ензима код грашка, особено ЕПСХ из СРБ соја који је утицао на повећање активности рРх и gРх, док је ЕПСХ из ИТА соја имао позитиван ефекат на активност аРх и САТ. Ово наглашава разноврсност и комплексност дејства полисахарида изолованих из у побољшању активности ензима у биљкама. Са друге стране, полисахариди из СРБ соја су имали позитиван ефекат на неутрализацију DPPH и ABTS радикала како у оптималним условима тако и у условима стреса, док је највећа скевенџер активност примећена код биљака чија су семена подвргнута третману са екстрактом ИПСХ СРБ. Исто тако, важно је нагласити да је ЕПСХ из СРБ соја такође имао значајан утицај на неутрализацију оба радикала како у екстракту корена грашка тако и у надземном делу, што указује на значајан потенцијал полисахарида као антиоксиданаса и заштитника од слободних радикала. Додатно, резултати сугеришу да се у условима стреса, као што је суша, биљке активније боре против слободних радикала путем повећане ОН активности и липидне пероксидације, што има значајне импликације за разумевање одговора биљака на стресне услове и потенцијалних стратегија за заштиту биљака.

Хемијска карактеризације екстраката грашка је указала на значајну квантитативну и квалитативну варијабилност у саставу екстраката грашка, која је имала важан утицај на испитивану антиоксидативну активност. Резултати сугеришу да секундарни метаболити, конкретно флавоноид нарингенин и његов гликозид нарингин, су највероватнији одговорни за инхибицију липидне пероксидације и неутрализацију испитиваних радикала, укључујући ABTS и ОН радикал. Са друге стране, за ензимску активност су највероватније одговорне фенолне киселине, као што је протокатехинска киселина, која је била највише присутна у екстракту биљке чије је семе подвргнуто биопрајмингу са ЕПСХ из ИТА соја. Додатно, примена полисахарида у третману семена грашка највероватније је допринела и

побољшаном коришћењу растворљивих полисахарида као извора угљеника и азота у биљци, с обзиром да утицај биопрајминга се огледа и у повећању садржаја протеина у екстрактима грашка чија су семена третирана полисахаридима. Укратко, истраживање је показало да су полисахариди пореклом из гљиве *S. commune* Fr. значајно побољшали антиоксидативну активност у екстрактима грашка, са најзначајнијим ефектом полисахарида из СРБ соја. Конкретно, екстракт гљиве ИПСХ СРБ је испољио јачи ефекат на неензимску антиоксидативну активност екстракта грашка, док је ЕПСХ СРБ имао већи утицај на ензимску активност. Ово додатно поткрепљују и резултати карактеризације ЕПСХ и ИПСХ пореклом из СРБ соја који су показали да су у питању комплекси полисахарида и секундарних метаболита, што даље указује на синергистички ефекат. Штавише, истицање различитих аспеката антиоксидативног деловања полисахарида кроз испитивање ензимске и неензимске активности доприноси разумевању њиховог комплексног механизма деловања на одбрану и заштиту биљака, и омогућава нове погледе на примену биопрајминга у пољопривреди.

Мултидисциплинарни приступ истраживању у оквиру ове докторске дисертације је од изузетног значаја за примењену науку с обзиром да представља фундаментални пут ка формирању нових органских производа. Креирањем природног и еколошки прихватљивог производа за биопрајминг семена омогућава се ублажавање и/или превазилажење абиотичког стреса у биљној производњи, а самим тим отварају се и могућности пласирања производа на тржиште. Штавише, научна заједница сваким даном пружа све више доказа о улози коју играју различите компоненте пред-герминативног метаболизма у одговору семена на прајминг, али је неопходно дубље разумевање таквих механизма како би се формирали прајмери „нове генерације“. Стога би будуће студије, требале да се фокусирају не само на откривање нових биоагенса за прајминг семена, већ и на механизме њихових деловања.

7. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Abd Razak, D.L., Jamaluddin, A., Abd Rashid, N.Y., Sani, N.A., Abdul Manan, M. (2020). Assessment of cosmeceutical potentials of selected mushroom fruitbody extracts through evaluation of antioxidant, anti-hyaluronidase and anti-tyrosinase activity. *J*, 3(3), 329-342.
2. Abdel Latef, A.A.H., Mostofa, M.G., Rahman, M.M., Abdel-Farid, I.B., Tran, L.S.P. (2019). Extracts from yeast and carrot roots enhance maize performance under seawater-induced salt stress by altering physio-biochemical characteristics of stressed plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 966-979.
3. Abdelrahman, H., Efaq, A.N., Al-Gheethi, A., Al-Sahari, M., Radin, M., Talip, B.A., Amir, H. (2019). Optimization of algicidal activity of indigenous strain *Schizophyllum commune* 104UTHM against *Microcystis aeruginosa* in freshwater using response surface methodology. *Desalination and Water Treatment*, 171, 356-368.
4. Abdul-Baki, A.A., Anderson, J.D. (1973). Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Science*, 13, 630-633.
5. Abdullah, N., Ismail, S.M., Aminudin, N., Shuib, A.S., Lau, B.F. (2012). Evaluation of selected culinary-medicinal mushrooms for antioxidant and ACE inhibitory activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1-12.
6. Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F., Machida, M. (2006). Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia*, 162, 143-153.
7. Abraham, E.P., Newton, G.G.F., Crawford, K., Burton, H.S., Hale, C.W. (1953). Cephalosporin N: a new type of penicillin. *Nature*, 171(4347), 343-343.
8. Acanto, R., Cuaderes, V.H., Gomoto, P. (2022). Phytochemical screening, cytotoxic activity, and proximate analysis of split gill mushroom (*Schizophyllum commune*). *JPAIR Multidisciplinary Research*, 47(1), 15-29.
9. Adejoye O.D., Fasidi, I.O. (2009). Effect of cultural conditions on biomass and laccase production in submerged medium by *Schizophyllum commune* (Fr.), a Nigerian edible mushroom. *Electronic Journal of Environmental Agricultural & Food Chemistry*, 8, 1186-1193.
10. Adl, S.M., Bass, D., Lane, C.E., Lukeš, J., Schoch, C.L., Smirnov, A., Zhang, Q. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4-119.
11. Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. Academic press. In *Methods in Enzymology*. Vol. 105, 121-126.
12. Afzal, I., Javed, T., Amirkhani, M., Taylor, A.G. (2020). Modern seed technology: Seed coating delivery systems for enhancing seed and crop performance. *Agriculture*, 10(11), 526.
13. Agger, T., Spohr, A.B., Carlsen, M., Nielsen, J. (1998). Growth and product formation of *Aspergillus oryzae* during submerged cultivations: Verification of a morphologically structured model using fluorescent probes. *Biotechnology and Bioengineering*, 57, 321-329.
14. Ahmad, P., John, R., Sarwat, M., Umar, S. (2012). Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. *International Journal of Plant Production*, 2(4), 353-366.
15. Ahmed, B., Rizvi, A., Zaidi, A., Khan, M.S., Musarrat, J. (2019). Understanding the phyto-interaction of heavy metal oxide bulk and nanoparticles: evaluation of seed germination, growth, bioaccumulation, and metallothionein production. *RSC Advances*, 9(8), 4210-4225.
16. Ainsworth, G.C. (2008). *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. Cabi.
17. Aisui, S., Nakagiri, S., Otawara, S. (1976). Preparation of cholesterol esterase. Japan; JPS539391 A.
18. Akiyuni, Y., Takashi, S. (2000). Anticancer Composition. WO 01/54724 A1.
19. Al Azad, S., Ai Ping, V.C. (2021). Comparison of protein and amino acids in the extracts of two edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju* and *Schizophyllum commune*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 12(09), 286-296.

20. Al-Azad, S., Ping, V.C. (2022). Antioxidant properties and antimicrobial activity in the extracts of two edible mushroom, *Pleurotus sajor caju* and *Schizophyllum commune*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 13(09), 352-361.
21. Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology* (No. Ed. 4). John Wiley and Sons.
22. Ali, M., Hayat, S., Ahmad, H., Ghani, M.I., Amin, B., Atif, M.J., Cheng, Z. (2019). Priming of *Solanum melongena* L. seeds enhances germination, alters antioxidant enzymes, modulates ROS, and improves early seedling growth: indicating aqueous garlic extract as seed-priming bio-stimulant for eggplant production. *Applied Sciences*, 9(11), 2203.
23. Al-Jebory, E.I. (2012). Effect of water stress on carbohydrate metabolism during *Pisum sativum* seedlings growth. *Euphrates Journal of Agriculture Science*, 4(4), 1-12.
24. Almási, É., Sahu, N., Krizsán, K., Bálint, B., Kovács, G.M., Kiss, B., Nagy, L.G. (2019). Comparative genomics reveals unique wood-decay strategies and fruiting body development in the *Schizophyllaceae*. *New Phytologist*, 224(2), 902-915.
25. Almeselmani, M., Abdullah, F., Hareri, F., Naaesan, M., Ammar, M.A., ZuherKanbar, O. (2011). Effect of drought on different physiological characters and yield component in different varieties of Syrian durum wheat. *Journal of Agricultural Science*, 3(3), 127.
26. Al-Quraan, N.A., Al-Ajlouni, Z.I., Qawasma, N.F. (2021). Physiological and biochemical characterization of the GABA shunt pathway in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings under drought stress. *Horticulturae*, 7(6), 125.
27. Al-Salihi, A.S.R.; Lau, B.F. (2022). Antioxidant activities and chemical composition of hot water-soluble extracts and fractions of selected *Schizophyllum commune* Fr. strains. *International Journal of Health Science*, 6, 3976–3994
28. Ander, P., Hatakka, A., Eriksson, K.E. (1980). Vanillic acid metabolism by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Archives of Microbiology*, 125, 189-202.
29. Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 768-778.
30. Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
31. Arafa, S.A., Attia, K.A., Niedbała, G., Piekutowska, M., Alamery, S., Abdelaal, K., Attallah, S.Y. (2021). Seed priming boost adaptation in pea plants under drought stress. *Plants*, 10(10), 2201.
32. Arantes, V., Goodell, B. (2014). Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: a review. *Deterioration and Protection of Sustainable Biomaterials*, 3-21.
33. Arnao, M.B.; Cano, A.; Acosta, M. (2001) The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73,239–244.
34. Aswani, V., Rajsheel, P., Bapatla, R.B., Sunil, B., Raghavendra, A.S. (2019). Oxidative stress induced in chloroplasts or mitochondria promotes proline accumulation in leaves of pea (*Pisum sativum*): another example of chloroplast-mitochondria interactions. *Protoplasma*, 256, 449-457.
35. Aswathi, K.R., Kalaji, H.M., Puthur, J.T. (2022). Seed priming of plants aiding in drought stress tolerance and faster recovery: a review. *Plant Growth Regulation*, 1-19.
36. Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761-1778.
37. Barzee, T.J., Cao, L., Pan, Z., Zhang, R. (2021). Fungi for future foods. *Journal of Future Foods*, 1(1), 25-37.

38. Bässler, C., Müller, J., Dziock, F., Brandl, R. (2010). Effects of resource availability and climate on the diversity of wood-decaying fungi. *Journal of Ecology*, 98(4), 822-832.
39. Bässler, C., Müller, J., Cadotte, M.W., Heibl, C., Bradtka, J.H., Thorn, S., Halbwachs, H. (2016). Functional response of lignicolous fungal guilds to bark beetle deforestation. *Ecological Indicators*, 65, 149-160.
40. Basso, V., Schiavenin, C., Mendonça, S., de Siqueira, F.G., Salvador, M., Camassola, M. (2020). Chemical features and antioxidant profile by *Schizophyllum commune* produced on different agroindustrial wastes and byproducts of biodiesel production. *Food Chemistry*, 329, 127089.
41. Bates, L.S., Waldren, R.A., Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
42. Bayat, M., Zargar, M., Murtazova, K.M.S., Nakhaev, M.R., Shkurkin, S.I. (2022). Ameliorating seed germination and seedling growth of nano-primed wheat and flax seeds using seven biogenic metal-based nanoparticles. *Agronomy*, 12(4), 811.
43. Behrendt, C., Blanchette, R., Farrell, R., Iverson, S. (1997). Method for improving the efficiency of chemical pulping processes by pretreating wood or pulpwood with white rot fungi. WO/1997/013025 A1.
44. Benzie, I.F., Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. In *Methods in Enzymology*, 299, 15-27). Academic press.
45. Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., Nonogaki, H. (2013). Seeds. Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd Edition. Springer New York, NY.
46. Bibi, F., Rahman, A. (2023). An overview of climate change impacts on agriculture and their mitigation strategies. *Agriculture*, 13(8), 1508.
47. Bijalwan, P., Raturi, A., Mishra, A.C. (2018). Character association and path analysis studies in garden pea (*Pisum sativum* L.) for yield and yield attributes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7, 3491-3495.
48. Bisen, K., Keswani, C., Mishra, S., Saxena, A., Rakshit, A., Singh, H.B. (2015). Unrealized potential of seed biopriming for versatile agriculture. *Nutrient Use Efficiency: From Basics to Advances*, 193-206.
49. Biskup, I., Golonka, I., Sroka, Z., Gamian, A. (2013). Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 67, 958-963.
50. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91(2), 179-194.
51. Bluhm, T. L., Deslandes, Y., Marchessault, R. H., Pérez, S., Rinaudo, M. (1982). Solid-state and solution conformation of scleroglucan. *Carbohydrate Research*, 100(1), 117-130.
52. Blum, A., Ebercon, A. (1981). Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science*, 21, 43-47.
53. Boddy, L., Hiscox, J. (2016). Fungal ecology: principles and mechanisms of colonization and competition by saprotrophic fungi. *Microbiology spectrum*, 4(6), 4-6.
54. Boonthatui, Y., Chongsuwat, R., Kittisakulnam, S. (2021). Production of antioxidant bioactive compounds during mycelium growth of *Schizophyllum commune* on different cereal media. *Chiang Mai University Journal of Natural Science*, 20(2), e2021032.
55. Bouremani, N., Cherif-Silini, H., Silini, A., Bouket, A.C., Luptakova, L., Alenezi, F.N., Belbahri, L. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): a rampart against the adverse effects of drought stress. *Water*, 15(3), 418.
56. Braccini, A.L., Ruiz, H.A., Braccini, M.C.L., Reis, M.S. (1996). Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de cloreto de sódio, manitol e polietilenglicol. *Revista Brasileira de Sementes*, 18, 10-16.

57. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry*, 72, 248-254
58. Carey, P.R., (1992) Biochemical application of raman and resonance raman spectroscopies. New York, Academic Press.
59. Carreno-Ruiz, S.D., Lázaro, A.A.Á., García, S.C., Hernández, R.G., Chen, J., Navarro, G.K.G., Cappello, R.E. (2019). New record of *Schizophyllum* (*Schizophyllaceae*) from Mexico and the confirmation of its edibility in the humid tropics. *Phytotaxa*, 413(2), 137-148.
60. Cartabia, M., Girometta, C.E., Baiguera, R.M., Buratti, S., Babbini, S., Bernicchia, A., Savino, E. (2022). Lignicolous fungi collected in northern Italy: Identification and morphological description of isolates. *Diversity*, 14(5), 413.
61. Cavia-Saiz, M., Busto, M.D., Pilar-Izquierdo, M.C., Ortega, N., Perez-Mateos, M., Muñiz, P. (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(7), 1238-1244.
62. Červenski, J., Medić-Pap, S., Danojević, D., Bugarski, D. (2020). Significance of vegetable crops rotation in garden plots from the perspective of producing health-safe food. In *Proceedings, 24th International Eco-Conference-11th Safe food, 23-25 September 2020, Novi Sad* (pp. 205-212). Novi Sad: Ecological movement of Novi Sad.
63. Chakraborti, S., Bera, K., Sadhukhan, S., Dutta, P. (2022). Bio-priming of seeds: Plant stress management and its underlying cellular, biochemical and molecular mechanisms. *Plant Stress*, 3, 100052.
64. Chance, B., Maehly, A.C. (1955). Assay of Catalase and Peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775.
65. Chandra Nayaka, S., Niranjana, S.R., Uday Shankar, A.C., Niranjana Raj, S., Reddy, M.S., Prakash, H.S., Mortensen, C.N. (2010). Seed biopriming with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the control of toxigenic *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 43(3), 264-282.
66. Chandrawanshi, N.K., Tandia, D.K., & Jadhav, S.K. (2017). Nutraceutical properties evaluation of *Schizophyllum commune*. *Indian Journal of Scientific Research*, 13(2), 57-62.
67. Channaoui, S., El Idrissi, I.S., Mazouz, H., Nabloussi, A. (2019). Reaction of some rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes to different drought stress levels during germination and seedling growth stages. *OCL*, 26, 23.
68. Chanu, W.T., Sinha, B., Chakrapani, K., Devi, K.S., Devi, H.C., Chakma, T., Thangjam, B. (2020). Biopriming of pea seeds with native *Trichoderma* species for enhanced seedling vigour. *Indian Journal of Plant Protection*, 48(4), 438-440.
69. Chaplin, M.F.; Kennedy, J.F. (1986). Carbohydrate Analysis: A Practical Approach, 2nd ed. (pp. 1–36), IRL Press: Oxford, UK.
70. Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S. (2003). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3), 239-264.
71. Chen, C., Shao, Y., Tao, Y., Wen, H. (2015). Optimization of dynamic microwave-assisted extraction of *Armillaria* polysaccharides using RSM, and their biological activity. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1263-1269.
72. Chen, C.C., Nargotra, P., Kuo, C.H., Liu, Y.C. (2023). High-molecular-weight exopolysaccharides production from *Tuber brochii* cultivated by submerged fermentation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4875.
73. Chen, L., Zhang, X., Zhang, M., Zhu, Y., Zhuo, R. (2022). Removal of heavy-metal pollutants by white rot fungi: Mechanisms, achievements, and perspectives. *Journal of Cleaner Production*, 354, 131681.
74. Chen, Z., Yin, C., Fan, X., Ma, K., Yao, F., Zhou, R., Gao, H. (2020). Characterization of physicochemical and biological properties of *Schizophyllum commune* polysaccharide extracted with different methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 1425-1434.

75. Chon, S.U., Kim, J.D. (2002). Biological activity and quantification of suspected allelochemicals from alfalfa plant parts. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 188, 281–285
76. Chroumpi, T., Mäkelä, M.R., de Vries, R.P. (2020). Engineering of primary carbon metabolism in filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 43, 107551.
77. Ćilerdžić, J., Galić, M., Vukojević, J., Brčeski, I., Stajić, M. (2017). Potential of selected fungal species to degrade wheat straw, the most abundant plant raw material in Europe. *BMC Plant Biology*, 17, 249.
78. CLSI M27-A2. (2002). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved. Standard. 2nd ed. NCCLS: Wayne, PA, USA, ISBN 1-56238-469-4.
79. CLSI M38. (2017). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Test of Filamentous Fungi. Approved. Standard. 3rd ed. Clinical and Laboratory Standard Institute: Wayne, PA, USA, ISBN 1-56238-830-4.
80. Cooke, W.B. (1961). The genus *Schizophyllum*. *Mycologia*, 53, 575–579.
81. Copoț, O., Tănase, C. (2019). Lignicolous fungi ecology-biotic and abiotic interactions in forest ecosystems. *Memoirs of the Scientific Sections of the Romanian Academy*, 42.
82. Couto, R.S., Toca-Herrera, J.L. (2007). Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 25, 558-569.
83. Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
84. Dalal, S.R., Hussein, M.H., El-Naggar, N.E.A., Mostafa, S.I., Shaaban-Dessuuki, S.A. (2021). Characterization of alginate extracted from *Sargassum latifolium* and its use in *Chlorella vulgaris* growth promotion and riboflavin drug delivery. *Scientific Reports*, 11(1), 16741.
85. Dar, M.I., Naikoo, M.I., Rehman, F., Naushin, F., Khan, F.A. (2016). Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*, 155-166.
86. Dawood, M.G. (2018). Stimulating plant tolerance against abiotic stress through seed priming. *Advances in Seed Priming*, 147-183.
87. Dawood, M.G., El-Lethy, S.R., Sadak, M.S. (2013). Role of methanol and yeast in improving growth, yield, nutritive value and antioxidants of soybean. *World Applied Sciences Journal*, 26(1), 6-14.
88. Deacon, J. W. (2005). *Fungal Biology*. John Wiley & Sons.
89. Debnath, S., Hore, S., Das, P., Saha, A.K. (2022). The evaluation of selected bioactivities of fungal mycelium of a wild *Schizophyllum commune* Fr. from submerged cultures. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 12(2), e3250-e3250.
90. Debnath, S., Saha, A.K., Das, P. (2017). Biological activities of *Schizophyllum commune* Fr.: A wild edible mushroom of Tripura, Northeast India. *Journal of Mycopathological Research*, 54(4), 469-475.
91. Deng, Y., Huang, Q., Hu, L., Liu, T., Zheng, B., Lu, D., Zhou, L. (2021). Enhanced exopolysaccharide yield and antioxidant activities of *Schizophyllum commune* fermented products by the addition of *Radix Puerariae*. *RSC Advances*, 11(60), 38219-38234.
92. Du, B., Yang, Y., Bian, Z., Xu, B. (2017a). Characterization and anti-inflammatory potential of an exopolysaccharide from submerged mycelial culture of *Schizophyllum commune*. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 252.
93. Du, B., Yang, Y., Bian, Z., Xu, B. (2017b). Molecular weight and helix conformation determine intestinal anti-inflammatory effects of exopolysaccharide from *Schizophyllum commune*. *Carbohydrate Polymers*, 172, 68-77.
94. Dulay, R.M.R., Vicente, J.J.A., Cruz, A.D., Gagarin, J.M., Fernando, W., Kalaw, S.P., Reyes, R.G. (2016). Antioxidant activity and total phenolic content of *Volvariella volvacea* and *Schizophyllum commune* mycelia cultured in indigenous liquid media. *Mycosphere*, 7(2), 131-138.

95. Eisaki, T., Eiichi, T., Yasutake, S., Toshihiko, W. (2004). Trehalose phosphorylase and its production. Japan; JP3563104 B2.
96. Ekowati, N., Mumpuni, A., Ratnaningtyas, N.I., Maharning, A.R. (2020). Compounds detection and inhibition activity of chloroform and ethyl acetate extracts of *Schizophyllum commune* on some cancer cell types. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(12).
97. Elisashvili, V. (2012). Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14, 211-239.
98. Ellan, K., Thayan, R., Raman, J., Hidari, K.I., Ismail, N., Sabaratnam, V. (2019). Anti-viral activity of culinary and medicinal mushroom extracts against dengue virus serotype 2: an in-vitro study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19, 1-12.
99. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V., Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95.
100. El-Saadony, F.M., Nawar, D.A., Zyada, H.G. (2017). Effect of foliar application with salicylic acid, garlic extract and proline on growth, yield and leaf anatomy of pea (*Pisum sativum* L.) grown under drought stress. *Middle East Journal of Applied Science*, 7(3), 633-650.
101. Emalfarb, M., Sinitsyn, A., Jundzil, R., Wery, J., Visser, J., Joosten, R., Koetsier, M. (2013). Method for improving the activity of cellulose enzyme mixtures in the saccharification (lingo)cellulosic material. United States; US 2013/0280764 A1.
102. Emsen, B., Kocabas, A., Kaya, A., Cinar, S., Aasim, M., Sadi, G. (2017). *In vitro* cytotoxicity, antibacterial and antioxidant properties of various extracts from *Schizophyllum commune* Fr. *Fresenius Environmental Bulletin and Advances in Food*, 26, 1144-1153.
103. Erdogan-Orhan, I., Altun, M.L., Sever-Yilmaz, B., Saltan, G. (2011). Anti-acetylcholinesterase and antioxidant assets of the major components (salicin, amentoflavone, and chlorogenic acid) and the extracts of *Viburnum opulus* and *Viburnum lantana* and their total phenol and flavonoid contents. *Journal of Medicinal Food*, 14(4), 434-440.
104. Espín, J.C.; Soler-Rivas, C.; Wichers, H.J. (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 648-656
105. Fahim, J.R., Attia, E.Z., Kamel, M.S. (2019). The phenolic profile of pea (*Pisum sativum*): a phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 18, 173-198.
106. Fang, Y., Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72, 673-689.
107. Farooq, M., Basra, S.M.A., Afzal, I., Khaliq, A. (2006). Optimization of hydropriming techniques for rice invigoration. *Seed Science and Technology*, 34, 507-512
108. Farooq, M., Aziz, T., Basra, S.M.A., Cheema, M.A., Rehman, H. (2008). Chilling tolerance in hybrid maize induced by seed priming with salicylic acid. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(2), 161-168.
109. Farooq, M., Aziz, T., Basra, S.M.A., Cheema, M.A., Rehman, H. (2008). Chilling tolerance in maize hybrid induced by seed priming with salicylic acid. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194, 161-168.
109. Fearon, D.T., Locksley, R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272(5258), 50-54.
110. Fiala, K., Blanka, V., Ladányi, Z., Szilassi, P., Benyhe, B., Dolin, D., Pálfai, I. (2014). Drought severity and its effect on agricultural production in the Hungarian-Serbian cross-border area. *Journal of Environmental Geography*, 7(3-4), 43-51.
111. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2023). Food and agriculture data. <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (visited 5th September 2023).

112. Frenken, T., Alacid, E., Berger, S.A., Bourne, E.C., Gerphagnon, M., Grossart, H.P., Agha, R. (2017). Integrating chytrid fungal parasites into plankton ecology: research gaps and needs. *Environmental microbiology*, 19(10), 3802-3822.
113. Fritz, H., Kennedy, D.A., Ishii, M., Fergusson, D., Fernandes, R., Cooley, K., Seely, D. (2015). Polysaccharide K and *Coriolus versicolor* extracts for lung cancer: a systematic review. *Integrative Cancer Therapies*, 14(3), 201-211.
114. Fukada, J., Kobayashi, S., Matsuda, H., Kato, J., Toshinori, S., Kojima, A. (1993). Skin cosmetic containing culture mixture of suehirotake (3754/24) (*Schizophyllum commune*). Japan; JP05286843.
115. Galbraith, J.C., Smith, J.E. (1969). Filamentous growth of *Aspergillus niger* in submerged shake culture. *Transactions of the British Mycological Society*, 52, 237-246.
116. García-Reyes, M., Beltrán-Hernández, R.I., Vázquez-Rodríguez, G.A., Coronel-Olivares, C., Medina-Moreno, S.A., Juárez-Santillán, L.F., Lucho-Constantino, C.A. (2017). Formation, morphology and biotechnological applications of filamentous fungal pellets: a review. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(3), 703-720.
117. Genshi, S., Takahiro, K. (2002). Method for decomposing exogenous endocrine disrupter. Japan; JP2002028692 A.
118. Ghezal, N., Rinez, I., Sbai, H., Saad, I., Farooq, M., Rinez, A., Haouala, R. (2016). Improvement of *Pisum sativum* salt stress tolerance by bio-priming their seeds using *Typha angustifolia* leaves aqueous extract. *South African Journal of Botany*, 105, 240-250.
119. Ghoulam, C., Foursy, A., Fares, K. (2002). Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 47(1), 39-50.
120. Gibbs, P.A., Seviour, R.J., Schmid, F. (2000). Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20, 17-48.
121. 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.
122. Gołębiowska-Pikania, G., Kopeć, P., Surówka, E., Janowiak, F., Krzewska, M., Dubas, E., Żur, I. (2017). Changes in protein abundance and activity induced by drought during generative development of winter barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Proteomics*, 169, 73-86.
123. Gow, N.A., Latge, J.P., Munro, C.A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology Spectrum*, 5(3), 10-1128.
124. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1), 131-138.
125. Gregory, P. (2002). Oxidation dyeing methods using N-acetylcysteine as a reducing agent and laccase as oxidizing agent. Europe; EP 1 165 026 B1. Guanghong, Z. (2016). Lobster feed capable of enhancing immunity. Europe; CN106616057 A.
126. Guan, S., Bao, Y.M., Jiang, B., An, L.J. (2006). Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide induced oxidative PC12 cell death. *European journal of pharmacology*, 538(1-3), 73-79.
127. Guanghong, Z. (2016). Lobster feed capable of enhancing immunity. Europe; CN106616057 A.
128. Hachmeister, K.A., Fung, D.Y. (1993). Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Critical Reviews in Microbiology*, 19(3), 137-188.
129. Hadrich, F., El Arbi, M., Boukhris, M., Sayadi, S., Cherif, S. (2014). Valorization of the peel of pea: *Pisum sativum* by evaluation of its antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Oleo Science*, 63(11), 1177-1183.

130. Haelewaters, D., Gafforov, Y. and Zhou, L.W., 2022. Biodiversity and conservation of fungi and fungus-like organisms. *Frontiers in Fungal Biology*, 3, p.973249.
131. Halliwell, B., Gutteridge, J.C. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *The Lancet*, 323(8391), 1396-1397.
132. Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Aruoma, O.I. (1987). The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Analytical Biochemistry*, 165(1), 215-219.
133. Hampton, J.G., Boelt, B., Rolston, M.P., Chastain, T.G. (2013). Effects of elevated CO₂ and temperature on seed quality. *The Journal of Agricultural Science*, 151(2), 154-162.
134. Hanafy, R.A., Lanjekar, V.B., Dhakephalkar, P.K., Callaghan, T.M., Dagar, S.S., Griffith, G.W., Youssef, N.H. (2019). Seven new Neocallimastigomycota genera from fecal samples of wild, zoo-housed, and domesticated herbivores: Description of *Ghazallomyces constrictus* gen. nov., sp. nov., *Aklioshbomyces papillarum* gen. nov., sp. nov., *Agriosomyces longus* gen. nov., sp. nov., *Capellomyces foraminis* gen. nov., sp. nov. and *Capellomyces elongatus* sp. nov., *Joblinomyces apicalis* gen. nov., sp. nov., *Khoyollomyces ramosus* gen. nov., sp. nov., and *Tahromyces munnarensis* gen. nov., sp. nov. *bioRxiv*, 642694.
135. Harki, E., Talou, T., Dargen, R. (1997) Purification, characterization and analysis of melanin extracted from *Tuber mehnosporum* Vitt. *Food Chemistry*, 58, 69-73.
136. Hawksworth, D.L., Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology spectrum*, 5(4), 10-1128.
137. He, M.Q., Zhao, R.L., Hyde, K.D., Begerow, D., Kemler, M., Yurkov, A., Kirk, P.M. (2019). Notes, outline and divergence times of Basidiomycota. *Fungal Diversity*, 99, 105-367.
138. Hibbett, D.S., Bauer, R., Binder, M., Giachini, A.J., Hosaka, K., Justo, A., Thorn, R.G. (2014). 14 Agaricomycetes. *Systematics and Evolution: part A*, 373-429.
139. Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509-547.
140. Hitoshi, U., Watanabe, J., Yoshio, H., Takeo, Y. (2000). Lignin decomposition using laccase and lignin decomposition agent. Japan; JP2000064185 A.
141. Hui, T.J.Z. (2016). Screening and application of marine *Schizophyllum commune* strain. Europe; CN105886408 A.
142. Ilum, N. (2000). Microbial xyloglycan endo- transglyco-sylases. Europe; EP 1005536 B1.
143. ISTA (2011). International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association. Bassersdorf, Switzerland.
144. ISTA (2022). International Rules for Seed Testing. Seed Science and Technology. Zurich, Switzerland.
145. Jiamworanunkul, S. (2020). Effective antioxidant production through submerged fermentation of edible mushrooms. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)*, 43(4).
146. Jiao, L., Li, J., Liu, F., Wang, J., Jiang, P., Li, B., Wu, W. (2021). Characterisation, chain conformation and antifatigue effect of steamed ginseng polysaccharides with different molecular weight. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 712836.
147. Jokanović, M.R., Jovičević, D., Tepić, A.N., Vujičić, B.L. (2006). Suitability of some green pea (*Pisum sativum* L.) varieties for processing. *Acta Periodica Technologica*, 37, 13-20.
148. Jovičević, D. (2011). Proizvodnja graška. U: Milošević, M., Kobiljski B. (eds.): Semenarstvo III. Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, ISBN: 978-86-80417-34-9.
149. Junninen, K., Similä, M., Kouki, J., Kotiranta, H. (2006). Assemblages of wood-inhabiting fungi along the gradients of succession and naturalness in boreal pine-dominated forests in Fennoscandia. *Ecography*, 29(1), 75-83.

150. Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, V., Wellner, N. and Ebringerova, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43, 195-203.
151. Kagami, M., Miki, T., Takimoto, G. (2014). Mycoloop: chytrids in aquatic food webs. *Frontiers in microbiology*, 5, 166.
152. Kalra, R., Conlan, X.A., Goel, M. (2020). Fungi as a potential source of pigments: Harnessing filamentous fungi. *Frontiers in Chemistry*, 8, 369.
153. Kamble, P.N., Giri, S.P., Mane, R.S., Tiwana, A. (2015). Estimation of chlorophyll content in young and adult leaves of some selected plants. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, 5(6), 306-310.
154. Karaman, M., Matavulj M. (2005). Macroelements and heavy metals in some lignicolous and tericolous fungi. *Proceedings of Natural Sciences, Matica Srpska, Novi Sad*, 108, 255-267
155. Karaman, M., Kaišarević, S., Somborski, J., Kebert, M., Matavulj, M. (2009). Biological activities of the lignicolous fungus *Meripilus giganteus* (Pers.: Pers.) Karst. *Archives of Biological Sciences*, 61(4), 853-861.
156. Karaman, M., Matavulj, M., Janjic, L. (2012). Antibacterial agents from lignicolous macrofungi. *Antimicrobial Agents*, 361-386.
157. Karaman, M., Stahl, M., Vulić, J., Vesić, M., Čanadanović-Brunet, J. (2014). Wild-growing lignicolous mushroom species as sources of novel agents with antioxidative and antibacterial potentials. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(3), 311-319.
158. Karaman, M., Atlagić, K., Novaković, A., Šibul, F., Živić, M., Stevanović, K., Pejin, B. (2019). Fatty acids predominantly affect anti-hydroxyl radical activity and FRAP value: The case study of two edible mushrooms. *Antioxidants*, 8(10), 480.
159. Karaman, M., Čapelja, E., Rašeta, M., Rakić, M. (2022). Diversity, chemistry, and environmental contamination of wild growing medicinal mushroom species as sources of biologically active substances (Antioxidants, Anti-Diabetics, and AChE Inhibitors). In *Biology, Cultivation and Applications of Mushrooms* (pp. 203-257). Singapore: Springer Singapore.
160. Karataş, İ., Öztürk, L., Demir, Y., Ünlükara, A., Kurunç, A., Düzdemir, O. (2014). Alterations in antioxidant enzyme activities and proline content in pea leaves under long-term drought stress. *Toxicology and Industrial Health*, 30(8), 693-700.
161. Kaur, M., Chadha, P., Kaur, S., Kaur, A., Kaur, R., Yadav, A.K., Kaur, R. (2018). *Schizophyllum commune* induced genotoxic and cytotoxic effects in *Spodoptera litura*. *Scientific Reports*, 8(1), 4693.
162. Kerkenar Anthonius inventor, NO voor TNO. (1988). Process for preparing steroids. Europe; EP 0274147 A.
163. Khardziani, T., Metreveli, E., Didebulidze, K., Elisashvili, V.I. (2020). Screening of Georgian medicinal mushrooms for their antibacterial activity and optimization of cultivation conditions for the split gill medicinal mushroom, *Schizophyllum commune* BCC64 (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 22(7).
164. Kikumoto, S., Yamamoto, O., Komatsu, N., Kobayashi, H., Kamasuka, T. (1978). Method of producing neoschizophyllan having novel pharmacological activity. United States; US4098661.
165. Kim, M.S., Park, Y.D., Sang-Rin, L.E.E. (2009). Method of using beta-glucan from *Schizophyllum commune*. United States; 20090023681 A1.
166. Kim, Y.T., Kim, E.H., Cheong, C., Williams, D.L., Kim, C.W., Lim, S.T. (2000). Structural characterization of β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 328(3), 331-341.
167. Kirk, P., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. (Eds.). (2008). *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. Cabi.
168. Klaus, A., Kozarski, M., Niksic, M., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Van Griensven, L.J. (2011). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2005-2011.

169. Knott, C.M., Belcher, S.J. (1998). Optimum sowing dates and plant populations for winter peas (*Pisum sativum*). *The Journal of Agricultural Science*, 131(4), 449-454.
170. Kono, H., Kondo, N., Hirabayashi, K., Ogata, M., Totani, K., Ikematsu, S., Osada, M. (2017). Two-dimensional NMR data of a water-soluble β -(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan from *Aureobasidium pullulans* and schizophyllan from *Schizophyllum commune*. *Data in brief*, 15, 382-388.
171. Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J.P., Van Griensven, L.J. (2011). Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food chemistry*, 129(4), 1667-1675.
172. Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvić, M.M., Todorović, N., Jakovljević, D., Van Griensven, L.J. (2012). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1-2), 144-153.
173. Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Petrović, P., Van Griensven, L. (2015). Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules*, 20(10), 19489-19525.
174. Kubala, S., Wojtyła, Ł., Quinet, M., Lechowska, K., Lutts, S., Garnczarska, M. (2015). Enhanced expression of the proline synthesis gene P5CSA in relation to seed osmopriming improvement of *Brassica napus* germination under salinity stress. *Journal of Plant Physiology*, 183, 1-12.
175. Kuilderd, H.A., Wu, G., Li, H., Zhou, Q. (2014) Combining biopolishing & bleach clean-up. United States; US 2014/0007357 A1.
176. Kul, L.J., Kim, S., Sadashiv, S., Cha, M., Lee, J., Roh, H. (2017). Biological saccharification method using biomass from heavy metal contaminated soil purifying plant. Europe; KR20160114.
177. Kumar, A., Bharti, A.K., Bezie, Y. (2022). *Schizophyllum commune*: A fungal cell-factory for production of valuable metabolites and enzymes. *BioResources*, 17(3), 5420.
178. Kumar, V., Suman, U., Rubal, Yadav, S.K. (2018). Flavonoid secondary metabolite: biosynthesis and role in growth and development in plants. *Recent Trends and Techniques In Plant Metabolic Engineering*, 19-45
179. Kumari, K. (2020). Mushrooms as source of dietary fiber and its medicinal value: A review article. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(2), 2075-2078.
180. Kumari, T., Deka, S.C. (2021). Potential health benefits of garden pea seeds and pods: A review. *Legume science*, 3(2), e82.
181. Kuwayama, Y., Thompson, A., Bernknopf, R., Zaitchik, B., Vail, P. (2019). Estimating the impact of drought on agriculture using the US Drought Monitor. *American Journal of Agricultural Economics*, 101(1), 193-210.
182. Lahuta, L.B., Szablińska-Piernik, J., Horbowicz, M. (2022). Changes in metabolic profiles of pea (*Pisum sativum* L.) as a result of repeated short-term soil drought and subsequent re-watering. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1704.
183. Leathers, T., Nunnally, M., Price, N. (2006). Co-production of schizophyllan and arabinoxylan from corn fiber. *Biotechnology Letters*, 28, 623-626.
184. Leathers, T.D., Nunnally, M.S., Stanley, A.M., Rich, J.O. (2016). Utilization of corn fiber for production of schizophyllan. *Biomass and Bioenergy*, 95, 132-136.
185. Lemieszek, M., Rzeski, W. (2012). Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. *Contemporary Oncology*, 16, 285-289.
186. Lichtenthaler, H.K., Wellburn, A.R. (1983) Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 603, 591-603.
187. Limbago, B. (2001). M100-S11, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology Newsletter*, 23(49), 88009-0.

188. Londoño-Hernández, L., Ramírez-Toro, C., Ruiz, H.A., Ascacio-Valdés, J.A., Aguilar-Gonzalez, M.A., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. (2017). *Rhizopus oryzae*—Ancient microbial resource with importance in modern food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 110-127.
189. Loo, D.S. (2006). Systemic antifungal agents: an update of established and new therapies. *Advances in Dermatology*, 22, 101-124.
190. López-Legarda, X., Rostro-Alanis, M., Parra-Saldivar, R., Villa-Pulgarín, J.A., Segura-Sánchez, F. (2021). Submerged cultivation, characterization and in vitro antitumor activity of polysaccharides from *Schizophyllum radiatum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 919-932.
191. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265–275.
192. Lum, M.S., Hanafi, M.M., Rafii, Y.M., Akmar, A.S.N. (2014). Effect of drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(5).
193. Lutts, S., Benincasa, P., Wojtyła, L., Kubala, S., Pace, R., Lechowska, K., Garnczarska, M. (2016). Seed priming: new comprehensive approaches for an old empirical technique. *New Challenges in Seed Biology—Basic and Translational Research Driving Seed Technology*, 46.
194. Ma, G., Yang, W., Zhao, L., Pei, F., Fang, D., Hu, Q. (2018). A critical review on the health promoting effects of mushrooms nutraceuticals. *Food Science and Human Wellness*, 7(2), 125-133.
195. Ma, T., Sun, X., Tian, C., Luo, J., Zheng, C., Zhan, J. (2016). Polysaccharide extraction from *Sphallerocarpus gracilis* roots by response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 162-170.
196. MacCarthy, P., Rice, J.A. (1985). Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substances. *Humic Substances In Soil, Sediment And Water*, 527-559.
197. Madadgar, S., AghaKouchak, A., Farahmand, A., Davis, S.J. (2017). Probabilistic estimates of drought impacts on agricultural production. *Geophysical Research Letters*, 44(15), 7799-7807.
198. Mahajan, M. (2022). *Schizophyllum commune*. *Emerging Infectious Diseases*, 28(3), 725.
199. Mahmood, A., Turgay, O.C., Farooq, M., Hayat, R. (2016). Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(8), fiw112.
200. Maiti, R.K., de la Rosa-Ibarra, M., Sandoval, N.D. (1994). Genotypic variability in glossy sorghum lines for resistance to drought, salinity and temperature stress at the seedling stage. *Journal of Plant Physiology*, 143(2), 241-244.
201. Manzoni, M., Bergomi, S., Rollini, M., Cavazzoni, V. (1999). Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, 21, 253-257.
202. Manzoni, M., Rollini, M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 555-564.
203. Margeot Antoine, M.F. (2009). Method for producing alcohol in a bio-refinery environment. WO/2009/098365.
204. Marthandan, V., Geetha, R., Kumutha, K., Renganathan, V. G., Karthikeyan, A., Ramalingam, J. (2020). Seed priming: a feasible strategy to enhance drought tolerance in crop plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8258.
205. Martin-Sanz, A., Caminero, C., Jing, R., Flavell, A.J., de la Vega, M.P. (2011). Genetic diversity among Spanish pea (*Pisum sativum* L.) landraces, pea cultivars and the World *Pisum* sp. core collection assessed by retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIPs). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(1), 166-178.
206. Mašková, T., Herben, T. (2018). Root: shoot ratio in developing seedlings: How seedlings change their allocation in response to seed mass and ambient nutrient supply. *Ecology and Evolution*, 8(14), 7143-7150.

207. Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.I., Lee, Y.C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 69-72.
208. Matavulj, M.N., Lolić, S.B., Vujčić, S.B., Milovac, S., Novaković, M.S., Karaman, M.A. (2013). *Schizophyllum commune*: the main cause of dying trees of the Banja Luka arbored walks and parks. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 124, 367-377.
209. Mathlouthi, M., Koenig, J.L. (1987). Vibrational spectra of carbohydrates. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 44, 7-89.
210. Matsui, S., Sato, T.T., Nakajima, K. (1986). Production of bilirubin oxidase. United States; US4569912.
211. Matthews, S., Powell, A.A. (1986). Environmental and physiological constraints on field performance of seeds. *HortScience*, 21(5), 1125-1128.
212. Maxted, N., Ambrose, M. (2001). Peas (*Pisum L.*). In *Plant Genetic Resources of Legumes In The Mediterranean* (pp. 181-190). Dordrecht: Springer Netherlands.
213. Mayakrishnan, V., Abdullah, N., Abidin, M.H.Z., Fadzil, N.H.M., Johari, N.M.K., Aminudin, N., Abidin, N.Z. (2013). Investigation of the antioxidative potential of various solvent fractions from fruiting bodies of *Schizophyllum commune* (Fr.) mushrooms and characterization of phytoconstituents. *Journal of Agricultural Science*, 5(6), 58-68.
214. McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W. (Eds.). (2015). *The Mycota: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. VII Systematics and Evolution: Part B* (Vol. 7). 2nd ed. Springer
215. McLean, R.J., Beauchemin, D., Clapham, L., Beveridge, T.J. (1990). Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(12), 3671-3677.
216. Melo, P.C.D., Collela, C.F., Sousa, T., Pacheco, D., Cotas, J., Gonçalves, A.M., Pereira, L. (2020). Seaweed-based products and mushroom β -glucan as tomato plant immunological inducers. *Vaccines*, 8(3), 524.
217. Meng, L., Zhang, L., Zhou, J., Gao, X., Duan, J. (2017). Method of preparing stachyose. Europe; CN 106636250 A.
218. Meng, Y., Lyu, F., Xu, X., Zhang, L. (2020). Recent advances in chain conformation and bioactivities of triple-helix polysaccharides. *Biomacromolecules*, 21(5), 1653-1677.
219. Meyer, V., Basenko, E.Y., Benz, J.P., Braus, G.H., Caddick, M.X., Csukai, M., Wösten, H.A. (2020). Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal biology and biotechnology*, 7(1), 1-23.
220. Mihailović, V., Pataki, I., Mikić, A., Katić, S., Vasiljević, S., Karagić, Đ., Milić, D. (2009). A new generation of NS forage crop cultivars. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo*, 46(1), 199-205.
221. Miljaković, D., Marinković, J., Tamindžić, G., Đorđević, V., Tintor, B., Milošević, D., Nikolić, Z. (2022). Bio-priming of soybean with *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus megaterium*: Strategy to improve seed germination and the initial seedling growth. *Plants*, 11(15), 1927.
222. Milošević, B. (2017). Kvantitativne i kvalitativne promene proteinskog graška (*Pisum sativum L.*) od formiranja do žetvene zrelosti semena. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
223. Milošević, M., Vujaković, M., Karagić, Đ. (2010). Vigour tests as indicators of seed viability. *Genetika*. 42(1), 103-118.
224. Milošević, M., Zlokolica, M. (1996). Vigor semena. Iz knjige: *Selekcija i semenarstvo* (Vol 111, Broj 1-2, pp. 33 – 42). Novi Sad.
225. Mimić, G., Živaljević, B., Blagojević, D., Pejak, B., Brdar, S. (2022). Quantifying the effects of drought using the crop moisture stress as an indicator of maize and sunflower yield reduction in Serbia. *Atmosphere*, 13(11), 1880.

226. Mirfat, A.H.S., Noorlidah, A., Vikineswary, S. (2014). Antimicrobial activities of split gill mushroom *Schizophyllum commune* Fr. *American Journal of Research Communication*, 2(7), 113-124
227. Mišković, J., Karaman, M., Rašeta, M., Krsmanović, N., Berežni, S., Jakovljević, D., Venturella, G. (2021). Comparison of two *Schizophyllum commune* strains in production of acetylcholinesterase inhibitors and antioxidants from submerged cultivation. *Journal of Fungi*, 7(2), 115.
228. Mišković, J., Rašeta, M., Krsmanović, N., Karaman, M. (2023). Update on mycochemical profile and selected biological activities of genus *Schizophyllum* Fr. 1815. *Microbiology Research*, 14(1), 409-429.
229. Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11-19.
230. Mohammadkhani, N., Heidari, R. (2008). Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. *Turkish Journal of Biology*, 32(1), 23-30.
231. Mona, S.A., Hashem, A., Abd_Allah, E.F., Alqarawi, A.A., Soliman, D.W.K., Wirth, S., Egamberdieva, D. (2017). Increased resistance of drought by *Trichoderma harzianum* fungal treatment correlates with increased secondary metabolites and proline content. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(8), 1751-1757.
232. Mongkontanawat, N., Thumrongchote, D. (2021). Effect of strains and extraction methods on β -glucan production, antioxidant properties, and FTIR Spectra from mushroom fruiting bodies of *Schizophyllum commune* Fr. in Thailand. Preprint version.
233. Monsigny, M., Petit, C., Roche, A.C. (1988). Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Analytical Biochemistry*, 175(2), 525-530.
234. Moradpour, M., Abdullah, S.N.A., Namasivayam, P. (2021). The impact of heat stress on morpho-physiological response and expression of specific genes in the heat stress-responsive transcriptional regulatory network in *Brassica oleracea*. *Plants*, 10(6), 1064.
235. Moretti, L.G., Crusciol, C.A.C., Bossolani, J.W., Calonego, J.C., Moreira, A., Garcia, A., Hungria, M. (2021). Beneficial microbial species and metabolites alleviate soybean oxidative damage and increase grain yield during short dry spells. *European Journal of Agronomy*, 127, 126293.
236. Mousaviasl, S., Saleh, T., Shojaosadati, S.A., Boddohi, S. (2018). Synthesis and characterization of schizophyllan nanogels via inverse emulsion using biobased materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 468-474.
237. Mrđa, J., Crnobarac, J., Dušanić, N., Jocić, S., Miklič, V. (2011). Germination energy as a parameter of seed quality in different sunflower genotypes. *Genetika-Belgrade*, 43(3), 427-436.
238. Nagadesi, P.K., Stephen, A. (2022). Mycochemicals and antidiabetic activity of lignicolous fungi—a critical review. *Bionature*, 13-30.
239. Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880.
240. Naranjo-Ortiz, M.A., Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101-2137.
241. Nazir, N., Nisar, M., Ahmad, S., Wadood, S.F., Jan, T., Zahoor, M., Ullah, A. (2020). Characterization of phenolic compounds in two novel lines of *Pisum sativum* L. along with their *in vitro* antioxidant potential. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 7639-7646.
242. Newton, G.G., Abraham, E.P. (1955). Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D- α -amino adipic acid. *Nature*, 175(4456), 548-548.
243. Nielsen, J.C., Nielsen, J. (2017). Development of fungal cell factories for the production of secondary metabolites: Linking genomics and metabolism. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(1), 5-12.
244. Nieter, A., Kelle, S., Linke, D., Berger, R.G. (2016). Feruloyl esterases from *Schizophyllum commune* to treat food industry side-streams. *Bioresource Technology*, 220, 38-46.

245. Nishikimi, M., Rao, N.A., Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 849-854.
246. Norisuye, T., Yanaki, T., Fujita, H. (1980). Triplehelix of a *Schizophyllum commune* polysaccharide in aqueous solution. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, 18, 547-558.
247. Noctor, G., Reichheld, J.P., Foyer, C.H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 80, pp. 3-12). Academic Press.
248. Novaković, A. (2015). Biopotencijal autohtonih gljiva u funkciji nutraceutika. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
249. Ohm, R.A., De Jong, J.F., Lugones, L.G., Aerts, A., Kothe, E., Stajich, J.E., Wösten, H.A. (2010). Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nature Biotechnology*, 28(9), 957-963.
250. Okçu, G., Kaya, M.D., Atak, M. (2005). Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29(4), 237-242.
251. Okutani, K. (1977). Gliotoxin produced by a strain of *Aspergillus* isolated from marine mud. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 43, 995-1000
252. Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 143, 48-53.
253. Pagano, A., Macovei, A., Balestrazzi, A. (2023). Molecular dynamics of seed priming at the crossroads between basic and applied research. *Plant Cell Reports*, 42(4), 657-688.
254. Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., Bansal, Y.K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), 293-304.
255. Paliwal, R., Giri, K., Rai, J.P.N. (2019). Microbial ligninolysis: Avenue for natural ecosystem management. In *Biotechnology: Concepts, Methodologies, Tools, and Applications* (pp. 1399-1423). IGI Global.
256. Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 25(3), 244-263.
257. Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., Aggelis, G. (2007). Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(11), 1060-1070.
258. Paparella, S., Araújo, S.S., Rossi, G., Wijayasinghe, M., Carbonera, D., Balestrazzi, A. (2015). Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant Cell Reports*, 34, 1281-1293.
259. Pasailiuk, M. (2020). Total flavonoid content, lipid peroxidation and total antioxidant activity of *Hericium coralloides*, *Fomes fomentarius* and *Schizophyllum commune* cultivated by the method of direct confrontation. *Italian Journal of Mycology*, 49, 25-37.
260. Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J., Flors, V. (2013). Primed plants do not forget. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 46-56.
261. Pedrol, N., Reigosa, M. J., González, L. (Eds.). (2006). *Allelopathy: a physiological process with ecological implications*. Springer Science & Business Media.
262. Peleg, Z., Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), 290-295.
263. Pereira, I.C., Catão, H., Caixeta, F. (2020). Seed physiological quality and seedling growth of pea under water and salt stress. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 24(2), 95-100
264. Petre, C.V., Balaes, T., Tănase, C. (2014). Lignicolous basidiomycetes as valuable biotechnological agents. *Memoirs of the Scientific Sections of the Romanian Academy*, 37, 37-62.

265. Petrović, G., Jovičić, D., Nikolić, Z., Tamindžić, G., Ignjatov, M., Milošević, D., Milošević, B. (2016). Comparative study of drought and salt stress effects on germination and seedling growth of pea. *Genetika*, 48(1), 373-381.
266. Phuket, S.R.N., Sangkaew, T., Chanapan, P., Techaoei, S. (2019). Biological activity of SS-glucans from edible mushroom, *Schizophyllum commune* in Thailand. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 110-112.
267. Piri, R., Moradi, A., Balouchi, H., Salehi, A. (2019). Improvement of cumin (*Cuminum cyminum*) seed performance under drought stress by seed coating and biopriming. *Scientia Horticulturae*, 257, 108667.
268. Pope, J.O., Brown, K., Fung, F., Hanlon, H.M., Neal, R., Palin, E.J., Reid, A. (2022). Investigation of future climate change over the British Isles using weather patterns. *Climate Dynamics*, 58(9-10), 2405-2419.
269. Prasad, J., Dey, R., Raghuvanshi, R. (2022). Exopolysaccharide-producing rhizospheric bacteria enhance yield via promoting wheat (*Triticum aestivum* L.) growth at early stages. *Microbiology*, 91, 757-769.
270. Price, A., Steele, K., Moore, B., Jones, R. (2002). Upland rice grown in soil-filled chambers and exposed to contrasting water-deficit regimes: II. Mapping quantitative trait loci for root morphology and distribution. *Field Crops Research*, 76, 25-43.
271. Raghukumar, S., Raghukumar, S. (2017). Fungi: Characteristics and classification. *Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems: Marine Fungi*, 1-15.
272. Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., Job, D. (2012). Seed germination and vigor. *Annual review of plant biology*, 63, 507-533.
273. Rakshit, A., Sunita, K., Pal, S., Singh, A., Singh, H.B. (2015). Bio-priming mediated nutrient use efficiency of crop species. *Nutrient Use Efficiency: From Basics to Advances*, 181-191.
274. Rašeta, M., Mišković, J., Čapelja, E., Zatora, E., Petrović Fabijan, A., Knežević, P., Karaman, M. (2023). Do *Ganoderma* Species Represent Novel Sources of Phenolic Based Antimicrobial Agents? *Molecules*, 28(7), 3264.
275. Rathore, H., Prasad, S., Kapri, M., Tiwari, A., Sharma, S. (2019). Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications. *Journal of Functional Foods*, 56, 182-193.
276. Rau, U. (1999). Production of schizophyllan. *Carbohydrate Biotechnology Protocols*, 43-55.
277. Rau, U. (2002). Schizophyllan. Biopolymers. Polysaccharides II: Polysaccharide from Eukaryotes. *Weinheim: Wiley-VCH*, 6, 61-91.
278. Reed, R.C., Bradford, K.J., Khanday, I. (2022). Seed germination and vigor: ensuring crop sustainability in a changing climate. *Heredity*, 128(6), 450-459.
279. Ren, L., Perera, C., Hemar, Y. (2012). Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. *Food & Function*, 3(11), 1118-1130.
280. Reyes, R.G., Grassel, W., Rau, U. (2009). Coconut water as a novel culture medium for the biotechnological production of schizophyllan. *Journal of Nature Studies*, 7(2), 43-48.
281. Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
282. Riley, R., Salamov, A.A., Brown, D.W., Nagy, L.G., Floudas, D., Held, B.W., Grigoriev, I.V. (2014). Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(27), 9923-9928.
283. Ropars, M., Aymard, C., Guillaume, A., Menir, S. (2012). Method for producing alcohols and/or solvents from paper pulps with recycling of the non-hydrolysed plant material in a regeneration reactor. Europe; EP 2516661B1.
284. Rout, D., Mondal, S., Chakraborty, I., Islam, S.S. (2008). The structure and conformation of a water-insoluble (1→3)-(1→6)-β-d-glucan from the fruiting bodies of *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Research*, 343(5), 982-987.

285. Ryuichiro, K., Yuli, T., Shiro, M. (2005). Method for decomposition of prion with wood decaying Basidiomycete. Japan; JP2005287322 A.
286. Saetang, N., Amornlerdpison, D., Rattanapot, T., Ramaraj, R., Unpaprom, Y. (2022). Processing of split gill mushroom as a biogenic material for functional food purpose. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 41, 102314.
287. Saha, D., Choyal, P., Mishra, U.N., Dey, P., Bose, B., Prathibha, M.D., Singhal, R.K. (2022). Drought stress responses and inducing tolerance by seed priming approach in plants. *Plant Stress*, 4, 100066.
288. Sairam, R.K. (1994). Effect of moisture-stress on physiological activities of two contrasting wheat genotypes. *Indian Journal of Experimental Biology*, 32, 594-594.
289. Sakamoto, K., Yamada, H., Shimizu, S. (1996). D-Pantolactone hydrolase and production thereof. Europe; EP 0504421 B
290. Sammut, C., Alvarado, P., Saar, I. (2019). *Schizophyllum amplum* (Agaricales, *Schizophyllaceae*): a rare Basidiomycete from Malta and Estonia. *Italian Journal of Mycology*, 48, 50-56.
291. Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., Machová, E. (1999). Microbial (1→ 3)- β -d-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 38(3), 247-253.
292. Santos, C.S., Carbas, B., Castanho, A., Vasconcelos, M.W., Vaz Patto, M.C., Domoney, C., Brites, C. (2019). Variation in pea (*Pisum sativum* L.) seed quality traits defined by physicochemical functional properties. *Foods*, 8(11), 570.
293. Sapre, S., Gontia-Mishra, I., Tiwari, S. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria ameliorates salinity stress in pea (*Pisum sativum*). *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(2), 647-656.
294. Schülein, M. (2002). Endoglucanases. United States; 6387690 B1.
295. Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105(12), 1413-1421.
296. Sekimoto, S., Rochon, D.A., Long, J.E., Dee, J.M., Berbee, M.L. (2011). A multigene phylogeny of Olpidium and its implications for early fungal evolution. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 1-10.
297. Shaffique, S., Khan, M.A., Wani, S.H., Imran, M., Kang, S.M., Pande, A., Lee, I.J. (2022). Biopriming of maize seeds with a novel bacterial strain SH-6 to enhance drought tolerance in south Korea. *Plants*, 11(13), 1674.
298. Shang, H., Zhou, H., Duan, M., Li, R., Wu, H., Lou, Y. (2018). Extraction condition optimization and effects of drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from comfrey (*Symphytum officinale* L.) root. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 889-899.
299. Sharma, A., Bhardwaj, R.D., Gupta, A.K. (2015b). Ferulic acid: A novel inducer of antioxidant enzymes in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Cereal Research Communications*, 43(3), 394-402.
300. Sharma, A., Kaur, R., Kaur, J., Garg, S., Bhatti, R., Kaur, A. (2021). An endophytic *Schizophyllum commune* Fr. exhibits *in-vitro* and *in-vivo* antidiabetic activity in streptozotocin induced diabetic rats. *AMB Express*, 11, 1-11.
301. Sharma, K.K., Singh, U.S., Sharma, P., Kumar, A., Sharma, L. (2015a). Seed treatments for sustainable agriculture-A review. *Journal of Applied and Natural Science*, 7(1), 521-539.
302. Shilpa, R., Lawre, S. (1985). Effect of titanium dioxide nano particles on seed germination and germination indices in onion. *Education*, 2001.
303. Shimazaki, J., Sato, T. (1984). Preparation of glucoamylase by *Schizophyllum commune* Fr. Japan; JPS59159779 A.
304. Shu, C.H., Hsu, H.J. (2011). Production of schizophyllan glucan by *Schizophyllum commune* ATCC 38548 from detoxified hydrolysate of rice hull. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(3), 387-393.

305. Shukla, N., Awasthi, R.P., Rawat, L., Kumar, J. (2015). Seed biopriming with drought tolerant isolates of *Trichoderma harzianum* promote growth and drought tolerance in *Triticum aestivum*. *Annals of Applied Biology*, 166(2), 171-182.
306. Schwab, E.K., Keller, N.P. (2008). Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research*, 112(2), 225-230.
307. Siddiqui, M.H., Al-Khaishany, M.Y., Al-Qutami, M.A., Al-Wahaibi, M.H., Grover, A., Ali, H.M., Al-Wahibi, M.S. (2015). Morphological and physiological characterization of different genotypes of faba bean under heat stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(5), 656-663.
308. Signorelli, S. (2016). The fermentation analogy: a point of view for understanding the intriguing role of proline accumulation in stressed plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1339.
309. Siika-Aho, M., et al. (2004). Method and enzymatic preparation for treatment of cellulose pulps. United States; 2004
310. Silber, J., Kramer, A., Labes, A., Tasdemir, D. (2016). From discovery to production: biotechnology of marine fungi for the production of new antibiotics. *Marine Drugs*, 14(7), 137.
311. Sim, C.Y.Y. (2014). Molecular identification of *Schizophyllum commune* and its production of schizophyllan. Doctoral dissertation.
312. Singh, A., Jatav, A.L., Singh, P., Singh, B.A., Singh, P., Sharma, S.K. (2017). Effect of seed priming treatments on seed quality parameters and storability of field pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), 161-163.
313. Singh, A., Rawat, D., Gautam, R., Yadav, S. (2023b) Effect of seed bio-priming with cold tolerant *Pseudomonas fluorescens* and soil application of cow urine on germination, growth and nutrient uptake in pea. *Journal of Agriculture, Biology and Applied Statistics*, 2(1), 1-9.
314. Singh, N., Bhuker, A., Jeevanadam, J. (2021). Effects of metal nanoparticle-mediated treatment on seed quality parameters of different crops. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394, 1067-1089.
315. Singh, P., Vaishnav, A., Liu, H., Xiong, C., Singh, H.B., Singh, B.K. (2023a). Seed biopriming for sustainable agriculture and ecosystem restoration. *Microbial Biotechnology*.
316. Singh, V., Upadhyay, R.S., Sarma, B.K., Singh, H.B. (2016). Seed bio-priming with *Trichoderma asperellum* effectively modulate plant growth promotion in pea. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 9(3), 361-365.
317. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Lester, P., Ed., *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
318. Sista Kameshwar, A.K., Qin, W. (2018). Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi. *Mycology*, 9(2), 93-105.
319. Smirnou, D., Knotek, P., Nesporova, K., Smejkalova, D., Pavlik, V., Franke, L., Velebny, V. (2017). Ultrasound-assisted production of highly-purified β -glucan schizophyllan and characterization of its immune properties. *Process Biochemistry*, 58, 313-319.
320. Smýkal, P., Aubert, G., Burstin, J., Coyne, C.J., Ellis, N.T., Flavell, A.J., Warkentin, T.D. (2012). Pea (*Pisum sativum* L.) in the genomic era. *Agronomy*, 2(2), 74-115.
321. Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 13561-13578.
322. Soltanian, S., Stuyven, E., Cox, E., Sorgeloos, P., Bossier, P. (2009). Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(2), 109-138.

323. Soltys-Kalina, D., Plich, J., Strzelczyk-Żyta, D., Śliwka, J., Marczewski, W. (2016). The effect of drought stress on the leaf relative water content and tuber yield of a half-sib family of 'Katahdin'-derived potato cultivars. *Breeding Science*, 66(2), 328-331.
324. Spatafora, J.W., Aime, M.C., Grigoriev, I.V., Martin, F., Stajich, J.E., Blackwell, M. (2017). The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *The Fungal Kingdom*, 1-34.
325. Srivastava, A.K., Suresh Kumar, J., Suprasanna, P. (2021). Seed 'primeomics': plants memorize their germination under stress. *Biological Reviews*, 96(5), 1723-1743.
326. Stajich, J.E., Berbee, M.L., Blackwell, M., Hibbett, D.S., James, T.Y., Spatafora, J.W., Taylor, J.W. (2009). The Fungi. *Current Biology*, 19, 840-845.
327. Stamets, P. (2015). Integrative fungal solution for protecting bees. United States; US9474776 B2.
328. Stamets, P. (2017). Integrative fungal solutions for protecting bees and overcoming colony collapse disorder (CCD). United States; 20170035820 A1.
329. Stanisavljević, N.S., Ilić, M.D., Matić, I.Z., Jovanović, Ž.S., Čupić, T., Dabić, D.Č., Tešić, Ž.L. (2016). Identification of phenolic compounds from seed coats of differently colored European varieties of pea (*Pisum sativum* L.) and characterization of their antioxidant and in vitro anticancer activities. *Nutrition and Cancer*, 68(6), 988-1000.
330. Stirk, W.A., Ördög, V., Van Staden, J. (1999). Identification of the cytokinin isopentenyladenine in a strain of *Arthonema africanum* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*, 35(1), 89-92.
331. Stone, B.A., Clarke, A.E. (1992). Chemistry and Biology of (1-6)-β-D-Glucans. *Victoria, Australia: La Trobe University Press*.
332. Sugiyama, M., Shimizu, H., Sugiyama, M., Kuratsu, T., Hirata, F. (1977). Process for producing cholesterol oxidase. United States; 4003794.
333. Sullivan, R., Smith, J.E., Rowan, N.J. (2006). Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine. *Perspectives in Biology and Medicine*, 49(2), 159-170.
334. Susumu, M., Satou, M., Takako, N.K. (1984). Preparation of bilirubin oxidase. Japan; JPS59135886 A.
335. Synytsya, A., Mičková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., Čopíková, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 548-556.
336. Szabados, L., Savouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89-97.
337. Szwajgier, D. (2015). Anticholinesterase activity of selected phenolic acids and flavonoids-interaction testing in model solutions. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(4).
338. Takahashi, J.A., Barbosa, B.V., Martins, B.D.A., P. Guirlanda, C., AF Moura, M. (2020). Use of the versatility of fungal metabolism to meet modern demands for healthy aging, functional foods, and sustainability. *Journal of Fungi*, 6(4), 223.
339. Takashi, K., Eisaku, T. (1994). Production of trehalose. Japan; JPH06189779 A.
340. Takemoto, S., Nakamura, H., Imamura, Y., Shimane, T. (2010). *Schizophyllum commune* as a ubiquitous plant parasite. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 44(4), 357-364.
341. Tamindžić, G., Červenski, J., Milošević, D., Vlajić, S., Nikolić, Z., Ignjatov, M. (2021b). The response of garden pea cultivars to simulated drought. *Acta Agriculturae Serbica*, 26(52), 167-173.
342. Tamindžić, G., Ignjatov, M., Miljaković, D., Červenski, J., Milošević, D., Nikolić, Z., Vasiljević, S. (2023). Seed priming treatments to improve heat stress tolerance of garden pea (*Pisum sativum* L.). *Agriculture*, 13(2), 439.

343. Tamindžić, G., Ignjatov, M., Milošević, D., Nikolić, Z., Kravljanac Kostić, L., Jovičić, D., Savić, J. (2021 a). Seed priming with zinc improves field performance of maize hybrids grown on calcareous chernozem. *Italian Journal of Agronomy*, 16(3).
344. Thirugnanasambandham, K., Sivakumar, V., Maran, J.P. (2015). Microwave-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1-5.
345. Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S.S., Vijayakumar, R. (2018). An introductory chapter: secondary metabolites. *Secondary Metabolites-Sources and Applications*, 3-21.
346. Tokumits, H.C.T.S.S.F.M. (2015). Ergothioneine-containing composition. Europe; JP 2015116173.
347. Tovar-Herrera, O.E., Martha-Paz, A.M., Pérez-LLano, Y., Aranda, E., Tacoronte-Morales, J.E., Pedrosa-Cabrera, M. T., Batista-García, R.A. (2018). *Schizophyllum commune*: An unexploited source for lignocellulose degrading enzymes. *Microbiology Open*, 7(3), e00637.
348. Tripathi, A.M., Tiwary, B.N. (2013). Biochemical constituents of a wild strain of *Schizophyllum commune* isolated from Achanakmar-Amarkantak Biosphere Reserve (ABR), India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 1431-1442.
349. Vázquez, G., Moreno-Casasola, P., Barrera, O. (1998). Interaction between algae and seed germination in tropical dune slack species: a facilitation process. *Aquatic Botany*, 60(4), 409-416.
350. Velderrain-Rodríguez, G.R., Torres-Moreno, H., Villegas-Ochoa, M.A., Ayala-Zavala, J.F., Robles-Zepeda, R.E., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G.A. (2018). Gallic acid content and an antioxidant mechanism are responsible for the antiproliferative activity of 'Ataulfo' mango peel on LS180 cells. *Molecules*, 23(3), 695.
351. Verbruggen, N., Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids*, 35, 753-759.
352. Wang, K., Cai, L., Yao, Y. (2021). Overview of nomenclature novelties of fungi in the world and China (2020). *Biodiversity Science*, 29(8), 1064.
353. Wassie, M., Zhang, W., Zhang, Q., Ji, K., Chen, L. (2019). Effect of heat stress on growth and physiological traits of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and a comprehensive evaluation for heat tolerance. *Agronomy*, 9(10), 597.
354. Webster, J., Weber, R. (2007). Introduction to fungi. Cambridge University Press.
355. Weete, J.D., Abril, M., Blackwell, M. (2010). Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PLoS one*, 5(5), e10899.
356. Weinstein, M.P.; Limbago, B.; Patel, J.B.; Mathers, A.J.; Burnham, C.; Mazzulli, T.; Campeau, S.; Munro, S.D.; Conville, P.S.; Doer, C. (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 9th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, Volume 32.
357. Whittaker, R.H. (1969). New Concepts of Kingdoms of Organisms: Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*, 163(3863), 150-160.
358. Widjanarko, S.B., Nugroho, A., Estiasih, T. (2011). Functional interaction components of protein isolates and glucomannan in food bars by FTIR and SEM studies. *African Journal of Food Science*, 5(1), 12-21.
359. Wiebe, M.G. (2004). Quorn™ Myco-protein-Overview of a successful fungal product. *Mycologist*, 18(1), 17-20.
360. Wijayawardene, N.N., Hyde, K.D., Al-Ani, L.K.T., Tedersoo, L., Haelewaters, D., Rajeshkumar, K.C. (2020). Outline of fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere* 11, 1060-1456.
361. Wing, L. (2001). Thermostable xylanases. Europe; EP 1 131 447 B1.
362. Wirth, S., Krause, K., Kunert, M., Broska, S., Paetz, C., Boland, W., Kothe, E. (2021). Function of sesquiterpenes from *Schizophyllum commune* in interspecific interactions. *PLoS one*, 16(1), e0245623.
363. Woo, E.E., Kim, J.Y., Kim, J.S., Kwon, S.W., Lee, I.K., Yun, B.S. (2019). Mannonerolidol, a new nerolidol mannoside from culture broth of *Schizophyllum commune*. *The Journal of Antibiotics*, 72(3), 178-180.

364. Wu, B., Hussain, M., Zhang, W., Stadler, M., Liu, X., Xiang, M. (2019). Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*, 10(3), 127-140.
365. Wu, D.T., Li, W.X., Wan, J.J., Hu, Y.C., Gan, R.Y., Zou, L. (2023). A Comprehensive review of pea (*Pisum sativum*L.): chemical composition, processing, health benefits, and food applications. *Foods*, 12(13), 2527.
366. Xiume, Z. (2016). Milk cow forage. Europe; CN106071100 A.
367. Xuan, T.D., Khang, D.T. (2018). Effects of exogenous application of protocatechuic acid and vanillic acid to chlorophylls, phenolics and antioxidant enzymes of rice (*Oryza sativa* L.) in submergence. *Molecules*, 23(3), 620.
368. Yan, J.K., Wu, L.X., Qiao, Z. R., Cai, W.D., Ma, H. (2019). Effect of different drying methods on the product quality and bioactive polysaccharides of bitter melon (*Momordica charantia* L.) slices. *Food Chemistry*, 271, 588-596..
369. Yang, C., Fan, Z., Chai, Q. (2018). Agronomic and economic benefits of pea/maize intercropping systems in relation to N fertilizer and maize density. *Agronomy*, 8(4), 52.
370. Yaxuan, W.S.L.H.Z.F.Z. (2014). *Phlegmarius phlegmaria* mingchegensis mycorrhizal fungi, method for production of huperzine A from the same, and application. Europe; CN 103834577 A.
371. Yelithao, K., Surayot, U., Lee, C., Palanisamy, S., Prabhu, N.M., Lee, J., You, S. (2019). Studies on structural properties and immune-enhancing activities of glycomannans from *Schizophyllum commune*. *Carbohydrate Polymers*, 218, 37-45.
372. Yi, F., Wang, Z., Baskin, C.C., Baskin, J.M., Ye, R., Sun, H., Huang, Z. (2019). Seed germination responses to seasonal temperature and drought stress are species-specific but not related to seed size in a desert steppe: Implications for effect of climate change on community structure. *Ecology and Evolution*, 9(4), 2149-2159.
373. Yigit, N., Sevik, H., Cetin, M., Kaya, N. (2016). Determination of the effect of drought stress on the seed germination in some plant species. *Water Stress in Plants*, 43, 62.
374. Yim, H.S., Chye, F.Y., Rao, V., Low, J.Y., Matanjun, P., How, S.E., Ho, C.W. (2013). Optimization of extraction time and temperature on antioxidant activity of *Schizophyllum commune* aqueous extract using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 275-283.
375. Yoshio, T., Kiyoshi, H., Tomoyuki, F., Tatsuo, T., Takeshi, H. (1995). Schizostatin of new physiologically active substance and its production. Japan; JPH0741454 A.
376. Yu, J.Y., Ha, J.Y., Kim, K.M., Jung, Y.S., Jung, J.C., Oh, S. (2015). Anti-inflammatory activities of licorice extract and its active compounds, glycyrrhizic acid, liquiritin and liquiritigenin, in BV2 cells and mice liver. *Molecules*, 20(7), 13041-13054.
377. Yuki Junishiro, S.M. (2001). Mold capable of degrading dioxin, degradation of dioxin with the use of the same, method for producing composts capable of degrading dioxin and method for growing plants. Europe; EP 1074611 A1.
378. Zhang, Y., Kong, H., Fang, Y., Nishinari, K., Phillips, G.O. (2013). Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and recent developments. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 1(1), 53-71.
379. Zhang, Y., Zhang, G., Ling, J. (2022). Medicinal fungi with antiviral effect. *Molecules*, 27(14), 4457.
380. Zheng, Z., Shetty, K. (2000). Enhancement of pea (*Pisum sativum*) seedling vigour and associated phenolic content by extracts of apple pomace fermented with *Trichoderma* spp. *Process Biochemistry*, 36(1-2), 79-84.
381. Zhong, K., Tong, L., Liu, L., Zhou, X., Liu, X., Zhang, Q., Zhou, S. (2015). Immunoregulatory and antitumor activity of schizophyllan under ultrasonic treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 302-308.
382. Zhou, X.W., Cong, W.R., Su, K.Q., & Zhang, Y.M. (2013). Ligninolytic enzymes from *Ganoderma* spp: current status and potential applications. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4), 416-426.

Јована Мишковић
Докторска дисертација

383. Zhu, N., Liu, J., Yang, J., Lin, Y., Yang, Y., Ji, L., Yuan, H. (2016). Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 1-22.
384. Zmitrovich, I.V., Wasser, S.P. (2011). Phylogenetic conundrum of the mushroom-forming fungi (Agaricomycetes). *Systematics and Evolution of Fungi*, 206-252.

8. ПРИЛОГ

8.1. Раст гљиве *S. commune* Fr. у потоњеној култури

Табела 8.1. Раст гљиве *S. commune* Fr. на сладном агару

Број петри плоче	Шифра културе/соја	Раст након 7 дана (cm)	Раст након 9 дана (cm)	Раст након 12 дана (cm)
1	0047 - ИТА	5,5	7,0	9,0
2		5,3	6,8	8,4
3		5,4	6,8	8,5
Средња вредност (cm)		5,4	6,9	8,6
4	0043 - СРБ	5,9	7,8	9,0
5		6,3	8,3	9,0
6		5,8	7,6	8,6
Средња вредност (cm)		6,0	7,9	8,9

График 8.1. Упоредни преглед раста два соја врсте *S. commune* Fr. на сладном агару

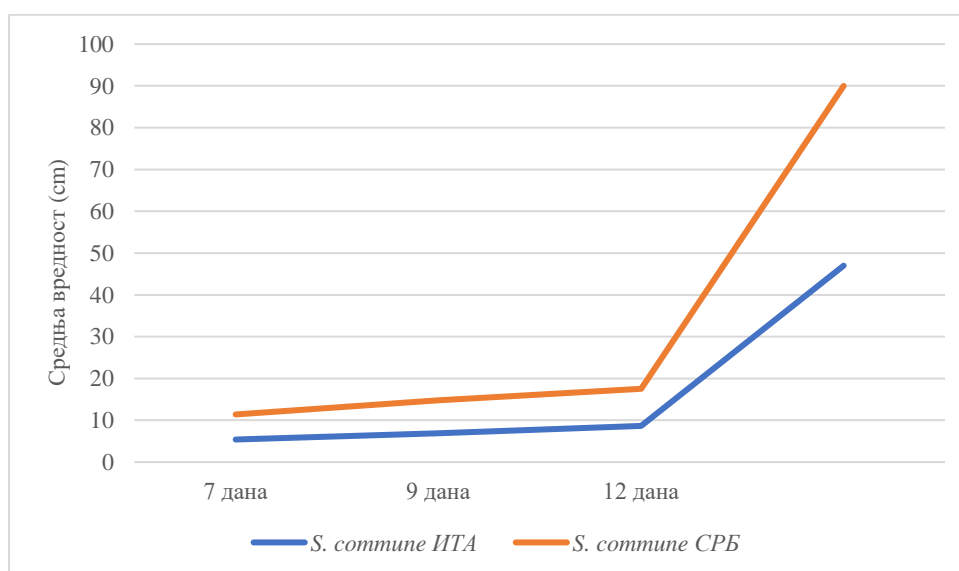
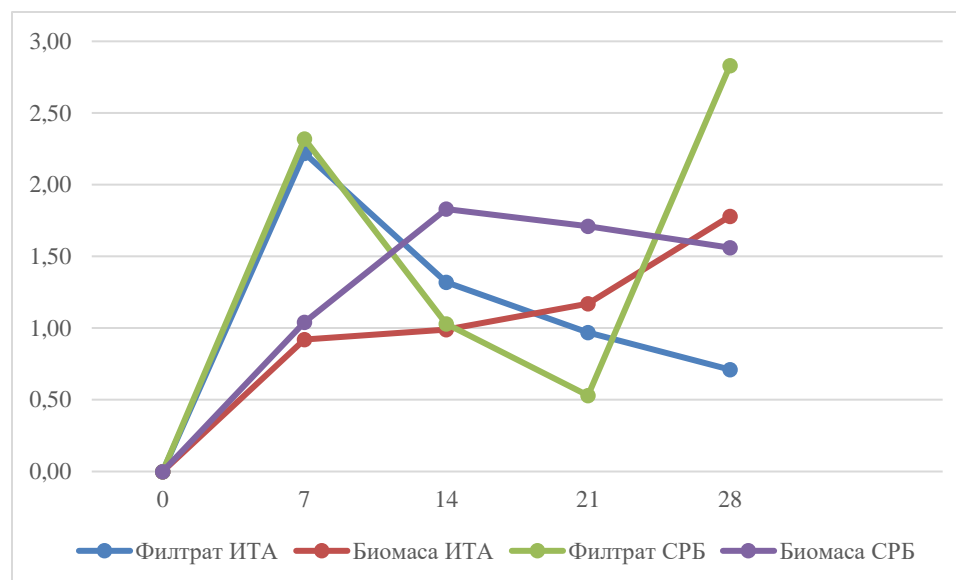


График 8.2. Упоредни преглед прираста филтрата и биомасе код ИТА и СРБ соја врсте *S. commune*

Fr.



8.2. Одређивање антирадикалске активности и редукционог потенцијала екстраката

Табела 8.2. Упоредни приказ антирадикалске активности етанолних екстраката врсте *S. commune* Fr.

Екстракти	SOA IC ₅₀ (µg/mL)	NO IC ₂₅ (µg/mL)	OH IC ₂₅ (µg/mL)	
<i>S. commune</i> Fr, ИТА				
Филтрат	7 дана	526,68 ± 152,45 ^a	614,02 ± 14,79 ^a	103,02 ± 12,23 ^a
	14 дана	652,14 ± 6,56 ^a	965,43 ± 129,75 ^a	124,27 ± 7,00 ^a
	21 дан	90% [*]	707,05 ± 34,84 ^a	110,85 ± 2,31 ^a
	28 дана	90% [*]	1161,41 ± 48,90 ^a	10,80 ± 0,54 ^a
Биомаса	7 дана	602,41 ± 0,01 ^a	788,80 ± 36,34 ^a	20,20 ± 1,36 ^a
	14 дана	216,98 ± 45,84 ^a	1182,78 ± 36,35 ^a	228,36 ± 3,25 ^a

	21 дан	634,14 ± 38,25 ^a	неактивно	44,29 ± 4,20 ^a
	28 дана	492,92 ± 125,11 ^a	неактивно	84,74 ± 2,36 ^a
<i>S. commune</i> Fr. СРБ				
	7 дана	635,74 ± 8,99 ^a	1794,48 ± 13,21 ^a	494,34 ± 59,08 ^a
Филтрат	14 дана	90 % *	<IC ₂₅ **	257,92 ± 0,01 ^a
	21 дан	90 % *	<IC ₂₅ **	261,38 ± 0,01 ^a
	28 дана	90 % *	<IC ₂₅ **	89,69 ± 0,38 ^a
	7 дана	161,60 ± 2,06 ^a	737,12 ± 32,91 ^a	170,57 ± 0,35 ^a
Биомаса	14 дана	235,14 ± 17,33 ^a	145,88 ± 2,83 ^a	163,94 ± 19,22 ^a
	21 дан	429,60 ± 44,01 ^a	785,34 ± 39,03 ^a	89,45 ± 0,01 ^a
	28 дана	218,01 ± 13,59 ^a	112,19 ± 19,73 ^a	85,57 ± 0,12 ^a

Резултати су представљени као средња вредност три понављања ± СД.

* Инхибиторна концентрација екстракта је већа од IC₅₀ вредности

** Није достигнута IC₂₅ вредност

^a У свакој колони различити суперскрипт указује на статистичку значајност (p < 0,05, Tukey's HSD тест).

Табела 8.3. Редукциони потенцијал (FRAP метода) етанолних и полисахаридних екстраката врсте *S. commune* Fr.

FRAP (mg аскорбинске киселине/g с.м.)					
Екстракти	<i>S. commune</i> Fr. ИТА		<i>S. commune</i> Fr. СРБ		
	ЕТ	ПСХ	ЕТ	ПСХ	
Филтрат	7 дана	42,58 ± 3,47 ^a	65,11 ± 6,27 ^a	61,81 ± 4,78 ^{a,c}	0,28 ± 0,09 ^b
	14 дана	99,00 ± 2,73 ^a	66,73 ± 12,11 ^a	107,86 ± 12,81 ^{a,c}	9,69 ± 3,67 ^b
	21 дан	91,65 ± 0,96 ^a	82,96 ± 0,94 ^a	89,97 ± 12,81 ^{a,c}	57,10 ± 2,35 ^b
	28 дана	47,82 ± 5,28 ^a	28,44 ± 7,72 ^a	80,28 ± 3,21 ^{a,c}	4,36 ± 1,36 ^b
Биомаса	7 дана	66,39 ± 3,84 ^a	40,03 ± 3,41 ^a	11,44 ± 0,84 ^{a,d}	20,89 ± 1,67 ^b
	14 дана	81,30 ± 1,98 ^a	6,49 ± 7,40 ^a	5,99 ± 0,20 ^{a,d}	9,55 ± 0,51 ^b
	21 дан	14,22 ± 1,32 ^a	79,12 ± 10,77 ^a	10,77 ± 1,05 ^{a,d}	5,61 ± 1,83 ^b
	28 дана	32,46 ± 1,27 ^a	33,67 ± 5,35 ^a	10,91 ± 0,46 ^{a,d}	0,90 ± 1,91 ^b

Резултати су представљени као средња вредност три понављања ± СД

^{a, b, c, d} У свакој колони различити суперскрипт указује на статистичку значајност ($p < 0,05$, Tukey's HSD тест и Friedman тест). Статистички значајне разлике се односе на типове екстраката: ЕТ или ПСХн- први суперскрипт (a,b), као и филтрат или биомаса – други суперскрипт (a,d)

8.2.1. Детерминација капацитета „хватања“ $O_2 \cdot^-$ радикала

Табела 8.4. Неутрализација $O_2 \cdot^-$ радикала етанолним екстрактима врсте *S. commune* Fr.

Радна конц. ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{кор}	RSC ₁ (%)	RSC ₂ (%)	RSC ₃ (%)	Средња вредност (%)
Филтрат 7 дана ИТА								
662,25	0,229	0,104	0,170	0,046	16,06	73,67	43,39	29,72
529,80	0,084	0,116	0,213	0,071	94,36	79,36	34,77	69,50
397,35	0,069	0,066	0,054	0,050	91,24	92,89	98,12	94,08
264,90	0,059	0,056	0,055	0,065	102,61	103,99	104,45	103,69
132,45	0,058	0,050	0,058	0,065	103,21	107,06	103,44	104,57
A _{kontrola}	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					634,48	/	418,88	526,68 ± 152,45
Филтрат 14 дана ИТА								
662,25	0,072	0,182	0,191	0,042	86,47	35,78	31,51	86,47
529,80	0,069	0,055	0,062	0,048	90,28	96,47	93,30	93,35
397,35	0,066	0,072	0,077	0,062	98,12	95,60	93,07	95,60
264,90	0,063	0,064	0,111	0,089	111,93	111,56	89,82	104,43
132,45	0,059	0,054	0,060	0,048	94,91	97,61	94,54	95,69
A _{kontrola}	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)					X	647,50	656,78	652,14 ± 6,56
Филтрат 21 дан ИТА								
662,25	0,063	0,070	0,066	0,050	94,08	90,64	92,29	92,34
529,80	0,076	0,078	0,062	0,060	92,29	91,38	98,85	94,17
397,35	0,093	0,088	0,081	0,068	88,26	90,78	93,94	90,99
264,90	0,058	0,060	0,062	0,045	93,76	93,21	92,02	93,00
132,45	0,059	0,062	0,062	0,050	95,83	94,45	94,40	94,89
A _{kontrola}	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	90%							
Филтрат 28 дана ИТА								
662,25	0,096	0,114	0,091	0,066	86,01	77,98	88,67	84,22
529,80	0,111	0,061	0,069	0,056	74,82	97,84	94,36	89,01
397,35	0,069	0,078	0,069	0,046	89,45	85,32	89,86	88,21
264,90	0,073	0,075	0,062	0,047	88,07	87,06	92,89	89,34

Јована Мишковић
Докторска дисертација

132,45	0,064	0,077	0,055	0,046	91,79	85,96	95,78	91,18
$A_{kontrola}$	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	90%							
Биомаса 7 дана ИТА								
662,25	0,196	0,149	0,131	0,055	35,09	56,70	65,14	35,09
529,80	0,135	0,129	0,151	0,050	61,24	63,94	53,94	59,71
397,35	0,124	0,119	0,132	0,043	63,26	65,23	59,50	62,66
264,90	0,124	0,137	0,128	0,046	64,27	58,17	62,52	61,65
132,45	0,106	0,098	0,118	0,047	73,12	76,79	67,75	72,55
$A_{kontrola}$	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					602,41	X	X	602,41 ± 0,01
Биомаса 14 дана ИТА								
662,25	0,138	0,095	0,147	0,045	57,66	77,02	53,49	62,72
529,80	0,138	0,153	0,160	0,045	57,52	50,41	47,43	57,52
397,35	0,187	0,156	0,167	0,043	33,94	48,17	43,21	41,77
264,90	0,149	0,138	0,120	0,050	54,63	59,63	68,17	60,81
132,45	0,184	0,178	0,148	0,047	37,20	40,05	53,76	38,62
$A_{kontrola}$	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					249,39	184,57	X	216,98 ± 45,84
Биомаса 21 дан ИТА								
662,25	0,170	0,152	0,155	0,045	42,48	51,06	49,68	47,74
529,80	0,149	0,133	0,147	0,057	57,80	65,23	58,81	60,61
397,35	0,136	0,131	0,192	0,064	67,20	69,40	41,42	68,30
264,90	0,125	0,319	0,132	0,045	63,21	-25,73	60,18	61,70
132,45	0,134	0,156	0,138	0,042	57,75	47,84	55,92	53,84
$A_{kontrola}$	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					607,10	146,57	661,19	634,14 ± 38,25
Биомаса 28 дана ИТА								
662,25	0,232	0,143	0,185	0,055	19,08	59,86	40,55	29,82
529,80	0,216	0,169	0,136	0,049	23,30	44,91	59,77	42,66
397,35	0,129	0,134	0,121	0,045	61,47	59,45	65,18	62,03
264,90	0,119	0,131	0,132	0,042	64,72	59,27	58,90	60,96
132,45	0,124	0,129	0,140	0,097	87,98	85,50	80,28	84,59
$A_{kontrola}$	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218

IC₅₀ (µg/mL)					404,46	X	581,38	492,92 ± 125,11	
Филтрат 7 дана СРБ									
662,25	0,233	0,107	0,223	0,088	33,72	91,42	38,21	54,45	
529,80	0,074	0,070	0,065	0,054	90,60	92,57	94,63	92,60	
397,35	0,059	0,062	0,061	0,049	95,69	94,04	94,63	94,79	
264,90	0,103	0,065	0,081	0,048	74,86	92,06	84,95	88,51	
132,45	0,062	0,058	0,060	0,046	92,57	94,17	93,49	93,41	
A _{kontrola}	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218	
IC₅₀ (µg/mL)					629,38	X	642,09	635,74 ± 8,99	
Филтрат 14 дана СРБ									
662,25	0,068	0,080	0,066	0,054	93,58	87,80	94,31	91,90	
529,80	0,063	0,065	0,065	0,053	95,18	94,59	94,63	94,80	
397,35	0,084	0,086	0,069	0,046	82,71	81,61	89,54	84,62	
264,90	0,059	0,068	0,057	0,052	97,06	92,80	97,94	95,93	
132,45	0,078	0,056	0,056	0,049	86,61	96,93	96,65	93,39	
A _{kontrola}	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218	
IC₅₀ (µg/mL)					90%				
Филтрат 21 дан СРБ									
662,25	0,108	0,064	0,076	0,060	78,21	98,26	92,80	89,76	
529,80	0,077	0,078	0,088	0,049	87,16	86,70	82,06	85,31	
397,35	0,072	0,078	0,062	0,064	96,15	93,58	100,83	96,85	
264,90	0,058	0,066	0,058	0,101	119,72	115,92	119,86	118,50	
132,45	0,055	0,062	0,061	0,051	98,35	94,91	95,60	96,28	
A _{kontrola}				0,212				0,218	
IC₅₀ (µg/mL)					90%				
Филтрат 28 дана СРБ									
662,25	0,062	0,059	0,073	0,056	97,34	98,76	92,43	96,18	
529,80	0,064	0,083	0,078	0,052	94,36	85,55	88,17	89,36	
397,35	0,059	0,054	0,064	0,046	93,94	96,19	91,65	93,93	
264,90	0,056	0,080	0,056	0,039	92,06	80,96	92,06	88,36	
132,45	0,057	0,077	0,063	0,047	95,32	86,24	92,66	91,41	
A _{kontrola}	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218	
IC₅₀ (µg/mL)					90%				
Биомаса 7 дана СРБ									

Јована Мишковић
Докторска дисертација

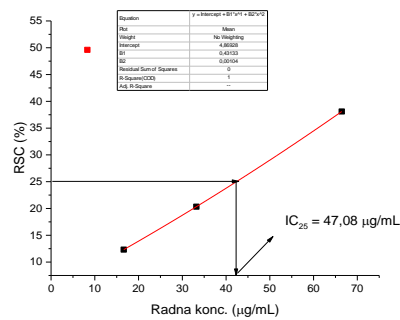
662,25	0,064	0,060	0,078	0,055	96,10	97,84	89,45	94,46
529,80	0,067	0,066	0,063	0,044	89,22	89,91	91,15	90,09
397,35	0,098	0,099	0,095	0,041	74,17	73,81	75,50	74,50
264,90	0,113	0,109	0,126	0,036	64,86	66,88	59,08	63,61
132,45	0,165	0,168	0,165	0,046	45,37	44,08	45,41	44,95
A _{kontrola}				0,212				0,218
IC₅₀ (µg/mL)					160,14	163,06	200,55	161,60 ± 2,06
Биомаса 14 дана СРБ								
662,25	0,227	0,195	0,209	0,051	19,31	33,85	27,75	23,53
529,80	0,212	0,240	0,206	0,046	23,62	11,19	26,70	20,50
397,35	0,217	0,264	0,221	0,055	25,46	3,90	23,76	17,71
264,90	0,230	0,199	0,200	0,047	15,87	30,18	29,40	29,79
132,45	0,117	0,115	0,113	0,039	64,57	65,25	66,46	65,43
A _{kontrola}	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218
IC₅₀ (µg/mL)					222,89	171,74	247,39	235,14 ± 17,33
Биомаса 21 дан СРБ								
662,25	0,230	0,236	0,246	0,042	13,90	11,24	6,47	10,54
529,80	0,164	0,082	0,210	0,048	46,70	84,13	25,41	36,06
397,35	0,163	0,155	0,185	0,047	46,47	50,41	36,79	44,56
264,90	0,154	0,156	0,159	0,050	52,52	51,47	50,09	51,36
132,45	0,131	0,081	0,133	0,046	60,87	84,04	60,14	68,35
A _{kontrola}	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218
IC₅₀ (µg/mL)					460,72	398,47	268,42	429,60 ± 44,01
Биомаса 28 дана СРБ								
662,25	0,110	0,096	0,068	0,047	74,50	77,80	90,69	76,15
529,80	0,170	0,151	0,131	0,048	52,74	52,71	61,61	61,61
397,35	0,148	0,122	0,134	0,045	58,98	65,00	59,17	61,05
264,90	0,126	0,157	0,127	0,044	57,46	48,03	61,97	55,82
132,45	0,201	0,171	0,118	0,047	46,45	43,07	67,29	52,27
A _{kontrola}	0,222	0,244	0,195	0,212				0,218
IC₅₀ (µg/mL)					208,40	227,63	X	218,01 ± 13,59

Јована Мишковић
Докторска дисертација

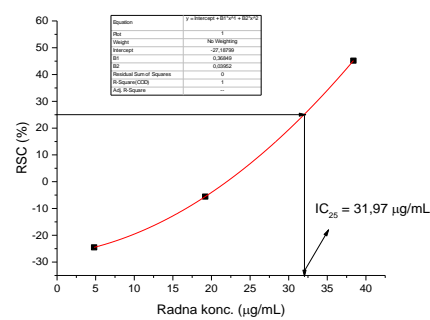
A_{kontrola} IC ₂₅ ($\mu\text{g/mL}$)	0,171	0,374	0,374			30,38	5,91	14,27	5,91 \pm 0,00
Контрола, надземни део, суша									
38,39	0,360	0,373	0,236	0,064	15,534	3,366	-0,752	43,987	
19,19	0,319	0,281	0,214	0,044	25,577	9,902	22,418	44,412	
9,60	0,374	0,251	0,246	0,048	20,773	-6,667	33,660	35,327	
4,80	0,245	0,281	0,266	0,043	27,756	33,987	22,255	27,026	
A_{kontrola} IC ₂₅ ($\mu\text{g/mL}$)	0,171	0,374	0,374		9,13	19,94	/	14,54 \pm 7,64	0,306
Хидропрајминг, надземни део, суша									
38,39	0,513	0,249	0,344	0,045	-52,941	33,333	2,288	-5,773	
19,19	0,351	0,198	0,255	0,051	1,993	52,190	33,431	29,205	
9,60	0,248	0,190	0,343	0,043	33,203	52,157	2,059	29,139	
4,80	0,120	0,192	0,191	0,043	74,902	51,111	51,536	59,183	
A_{kontrola} IC ₂₅ ($\mu\text{g/mL}$)	0,171	0,374	0,374		249,39	184,57	/	216,98 \pm 45,84	0,306
ЕПСХ ИТА, надземни део, суша									
38,39	0,145	0,171	0,317	0,049	68,627	60,131	12,418	47,059	
19,19	0,293	0,231	0,431	0,043	18,301	38,562	-26,797	10,022	
9,60	0,209	0,431	0,403	0,043	45,752	-26,797	-17,647	0,436	
4,80	0,28	0,331	0,164	0,059	27,778	11,111	65,686	34,858	
A_{kontrola} IC ₂₅ ($\mu\text{g/mL}$)	0,171	0,374	0,374		18,21	11,45	6,77	12,15 \pm 5,75	0,306
ИПСХ ИТА, надземни део, суша									
38,39	0,179	0,219	0,27	0,045	56,209	43,137	26,471	41,939	
19,19	0,218	0,23	0,32	0,045	43,464	39,542	10,131	31,046	
9,60	0,17	0,181	0,197	0,04	57,516	53,922	48,693	53,377	
4,80	0,224	0,219	0,195	0,043	40,850	42,484	50,327	44,553	
A_{kontrola}	0,171	0,374	0,374					0,306	

IC₂₅ (µg/mL)							/	/	16,64	16,64 ± 0,00
ЕПСХ СРБ, надземни део, оптимални услови										
38,39	0,285	0,213	0,222	0,046	5,357	33,849	30,397	23,201		
9,60	0,212	0,211	0,186	0,052	36,349	36,667	46,667	39,894		
2,40	0,192	0,259	0,230	0,047	42,500	16,032	27,698	28,743		
A _{kontrola}	0,262	0,241	0,249	0,127					0,252	
IC₂₅ (µg/mL)							21,29	5,17	/	13,23 ± 11,39
ИПСХ СРБ, надземни део, оптимални услови										
38,39	0,208	0,227	0,209	0,050	37,103	29,643	36,627	34,458		
9,60	0,245	0,255	0,212	0,055	24,841	20,833	37,937	27,870		
2,40	0,208	0,185	0,180	0,046	35,556	44,603	46,746	42,302		
A _{kontrola}	0,262	0,241	0,249	0,127					0,252	
IC₂₅ (µg/mL)								9,45	8,07	8,76 ± 0,98
ЕПСХ СРБ, надземни део, суша										
38,39	0,254	0,249	0,191	0,041	15,476	17,698	40,635	24,603		
9,60	0,278	0,221	0,225	0,044	7,381	29,762	28,056	21,733		
2,40	0,087	0,087	0,086	0,039	80,992	80,952	81,111	81,019		
A _{kontrola}	0,262	0,241	0,249	0,127					0,252	
IC₂₅ (µg/mL)							7,57	10,50	/	9,01 ± 2,03
ИПСХ СРБ, надземни део, суша										
38,39	0,267	0,312	0,339	0,046	12,143	-5,675	-16,190	-3,241		
9,60	0,272	0,189	0,249	0,049	11,825	44,405	20,675	25,635		
2,40	0,221	0,209	0,260	0,055	34,087	39,167	18,690	30,648		
A _{kontrola}	0,262	0,241	0,249	0,127					0,252	
IC₂₅ (µg/mL)							5,00	28,21		5,00 ± 0,00

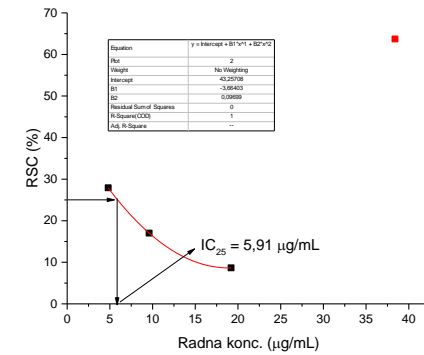
График 8.3.-8.13. Зависност RSC (%) и радне концентрације ($\mu\text{g}/\text{mL}$) метанолних екстраката врсте *Pisum sativum* L. у оптималним условима и условима стреса – суше након биопрајминга са езго- и интраполисахаридима гљиве код ОН теста (IC_{25} вредности)



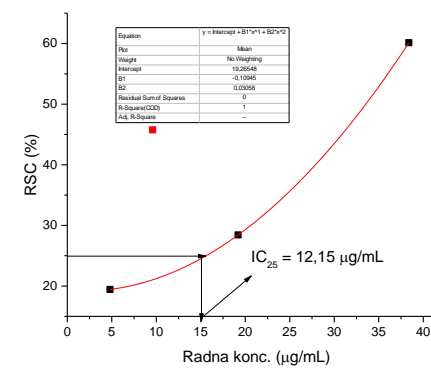
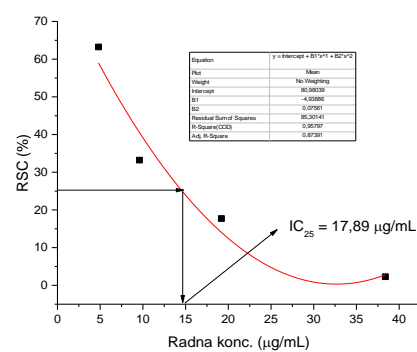
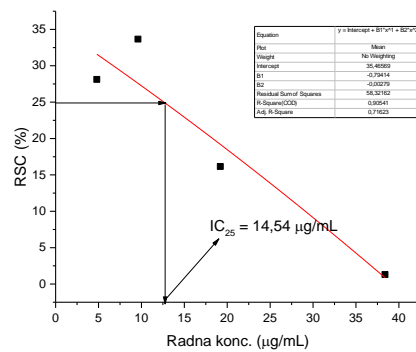
Контрола, надземни део, ОУ



ЕПСХ ИТА, надземни део, ОУ

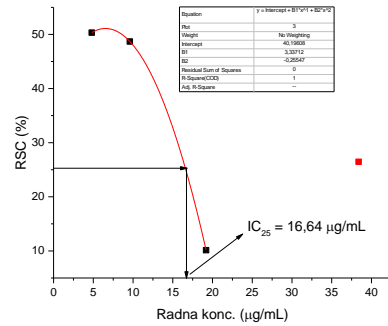


ИПСХ ИТА, надземни део, ОУ

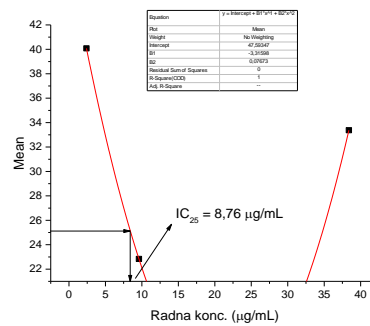


Јована Мишковић
Докторска дисертација

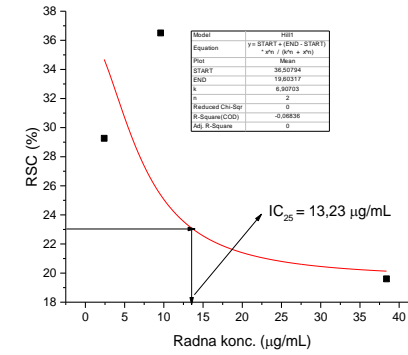
Контрола, надземни део, суша



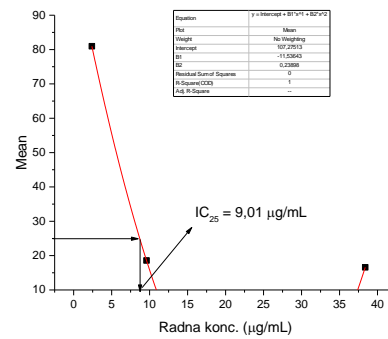
Хидропрајминг, надземни део, суша



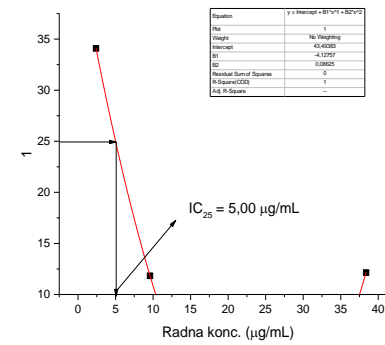
ЕПСХ ИТА, надземни део, суша



ИПСХ ИТА, надземни део, суша



ЕПСХ СРБ, надземни део, ОУ



ИПСХ СРБ, надземни део, ОУ

ЕПСХ СРБ, надземни део, суша

ИПСХ СРБ, надземни део, суша

8.2.2. Неутрализација NO радикала

Табела 8.6. Неутрализација NO радикала етанолним екстрактима врсте *S. commune* Fr.

Радна конц. ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁ (%)	RSC ₂ (%)	RSC ₃ (%)	Средња вредност (%)
Филтрат 7 дана ИТА								
2660,10	0,516	0,770	0,594	0,135	51,81	19,67	41,89	37,79
2216,75	0,494	0,554	0,567	0,135	54,53	47,00	45,28	48,94
1477,83	0,637	0,543	0,518	0,078	29,23	41,16	44,28	38,22
295,57	1,668	1,757	1,709	0,069	27,91	23,90	26,08	25,97
147,78	1,916	1,944	1,952	0,069	16,70	15,47	15,08	15,75
A _{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC ₂₅ ($\mu\text{g/mL}$)					624,48	603,57	291,44	614,02 ± 14,79
Филтрат 14 дана ИТА								
1477,83	0,613	0,624	0,583	0,051	28,81	27,43	32,71	29,65
1182,27	0,670	0,638	0,636	0,069	23,82	27,86	28,19	26,62
886,70	0,680	0,691	0,743	0,070	22,80	21,38	14,80	19,66
59,11	0,797	0,741	0,729	0,064	7,22	14,41	15,94	12,52
1477,83	0,613	0,624	0,583	0,051	28,81	27,43	32,71	29,65
A _{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC ₂₅ ($\mu\text{g/mL}$)					1057,18	1326,56	873,69	965,43 ± 129,75
Филтрат 21 дан ИТА								
1477,83	0,546	0,499	0,513	0,076	40,61	46,47	44,73	43,94
1182,27	0,577	0,577	0,569	0,060	34,54	34,52	35,53	34,86
886,70	0,590	0,598	0,544	0,061	32,95	31,97	38,76	34,56
59,11	0,650	0,674	0,716	0,059	25,18	22,19	16,81	21,39
1477,83	0,754	0,929	1,014	0,063	12,57	-9,63	-20,41	-5,82
A _{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC ₂₅ ($\mu\text{g/mL}$)					583,87	682,41	731,69	707,05 ± 34,84
Филтрат 28 дана ИТА								

Јована Мишковић
Докторска дисертација

1477,83	0,568	0,638	0,568	0,079	38,15	29,33	38,15	35,21
1182,27	0,655	0,676	0,647	0,070	26,05	23,34	27,04	25,48
886,70	0,678	1,218	0,717	0,072	23,30	-45,01	18,38	-1,11
59,11	0,800	0,761	0,749	0,069	7,38	12,29	13,90	11,19
1477,83	0,568	0,638	0,568	0,079	38,15	29,33	38,15	35,21
A _{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC ₂₅ (µg/mL)					926,14	1195,99	1126,83	1161,41 ± 48,90
Биомаса 7 дана ИТА								
1477,83	0,580	0,544	0,554	0,082	36,86	41,51	40,16	39,51
1182,27	0,626	0,614	0,607	0,070	29,59	31,16	32,09	30,95
886,70	0,660	0,649	0,652	0,079	26,49	27,81	27,48	27,26
59,11	0,695	0,696	0,693	0,065	20,24	20,11	20,44	20,27
1477,83	0,580	0,544	0,554	0,082	36,86	41,51	40,16	39,51
A _{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC ₂₅ (µg/mL)					825,70	787,67	753,05	788,80 ± 36,34
Биомаса 14 дана ИТА								
1477,83	0,532	0,542	0,569	0,093	44,44	43,22	39,77	42,48
1182,27	0,682	0,674	0,681	0,076	23,34	24,30	23,51	23,72
886,70	0,737	0,806	0,765	0,079	16,65	8,03	13,19	12,62
59,11	0,937	0,986	0,934	0,069	-9,90	-16,05	-9,52	-11,82
1477,83	0,984	1,028	1,290	0,066	-16,25	-21,73	-54,90	-30,96
A _{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC ₂₅ (µg/mL)					1157,08	1208,49	1082,20	1182,78 ± 36,35
Биомаса 21 дан ИТА								
1477,83	0,877	0,755	0,854	0,097	1,23	16,61	4,16	7,33
1182,27	0,998	0,965	1,023	0,073	-17,13	-12,85	-20,19	-16,72
886,70	1,120	1,001	1,048	0,065	-33,56	-18,43	-24,48	-25,49
59,11	1,102	1,131	1,165	0,064	-31,38	-35,03	-39,42	-35,27
1477,83	1,174	1,296	1,146	0,067	-40,06	-55,57	-36,61	-44,08
A _{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC ₂₅ (µg/mL)								/
Биомаса 28 дана ИТА								
1477,83	0,734	0,789	0,871	0,134	24,05	17,10	6,63	15,93
1182,27	0,764	0,816	0,979	0,092	14,87	8,25	-12,28	3,62

Јована Мишковић
Докторска дисертација

886,70	0,888	0,975	1,066	0,118	2,57	-8,44	-20,04	-8,64
59,11	0,949	1,070	1,168	0,091	-8,49	-23,85	-36,30	-22,88
1477,83	1,189	1,594	1,454	0,082	-40,16	-91,33	-73,61	-68,37
A_{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC₂₅ (µg/mL)								/
Филтрат 7 дана СРБ								
2660,10	0,730	0,715	0,747	0,074	17,01	18,89	14,80	16,90
2216,75	0,724	0,718	0,734	0,075	17,92	18,61	16,67	17,73
1477,83	0,992	0,993	1,015	0,078	-15,73	-15,87	-18,63	-16,75
591,13	1,036	1,093	1,269	0,080	-21,00	-28,23	-50,48	-33,24
A_{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC₂₅ (µg/mL)					1960,10	1785,14	1803,82	1794,48 ± 13,21
Филтрат 14 дана СРБ								
1477,83	0,730	0,715	0,747	0,074	17,01	18,89	14,80	91,90
1182,27	0,724	0,718	0,734	0,075	17,92	18,61	16,67	94,80
886,70	0,992	0,993	1,015	0,078	-15,73	-15,87	-18,63	84,62
59,11	1,036	1,093	1,269	0,080	-21,00	-28,23	-50,48	95,93
1477,83	1,826	2,073	1,860	0,065	-122,89	-154,11	-127,11	93,39
A_{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC₂₅ (µg/mL)	< IC₂₅							/
Филтрат 21 дан СРБ								
1477,83	0,773	0,895	0,835	0,107	15,63	0,18	7,78	7,86
1182,27	0,877	0,817	0,911	0,077	-1,34	6,30	-5,62	-0,22
886,70	0,980	0,921	0,919	0,076	-14,44	-7,03	-6,68	-9,38
59,11	0,984	0,887	1,056	0,073	-15,32	-2,99	-24,35	-14,22
1477,83	1,073	1,151	1,269	0,079	-25,87	-35,75	-50,73	-37,45
A_{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC₂₅ (µg/mL)	< IC₂₅							/
Филтрат 28 дана СРБ								
1477,83	0,838	0,845	0,879	0,098	6,34	5,54	1,16	4,35
1182,27	0,959	0,863	0,870	0,073	-12,23	-0,03	-0,89	-4,38
886,70	1,270	1,005	1,086	0,073	-51,47	-18,03	-28,20	-32,57
59,11	1,242	1,180	1,415	0,085	-46,42	-38,62	-68,29	-51,11

Јована Мишковић
Докторска дисертација

1477,83	1,674	1,746	1,906	0,072	-102,78	-111,90	-132,25	-115,65
A _{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC ₂₅ (µg/mL)	< IC ₂₅							
Биомаса 7 дана СРБ								
2660,10	0,286	0,273	0,269	0,066	72,11	73,80	74,27	73,39
2216,75	0,348	0,327	0,337	0,065	64,16	66,78	65,54	65,50
1477,83	0,405	0,324	0,367	0,077	58,48	68,70	63,33	63,50
1182,27	0,542	0,518	0,485	0,088	42,54	45,58	49,76	45,96
591,13	1,414	1,578	1,667	0,073	-69,68	-90,48	-101,75	-87,30
295,57	2,153	2,127	2,143	0,070	6,10	7,25	6,55	6,63
147,78	2,117	2,085	2,108	0,063	7,37	8,84	7,77	7,99
73,89	2,430	2,331	2,418	0,062	-6,76	-2,27	-6,22	-5,08
A _{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC ₂₅ (µg/mL)					925,22	760,38	713,85	737,12 ± 32,91
Биомаса 14 дана СРБ								
1477,83	1,571	1,424	1,547	0,100	-86,28	-67,62	-83,19	-79,03
1182,27	1,539	1,679	1,695	0,090	-83,38	-101,13	-103,15	-95,89
886,70	1,589	1,848	1,731	0,079	-91,09	-123,89	-109,03	-108,00
591,13	0,367	0,269	0,299	0,091	65,16	77,52	73,78	72,16
295,57	0,436	0,427	0,416	0,086	55,73	56,85	58,24	56,94
147,78	1,864	1,930	1,843	0,070	19,10	16,14	20,04	18,43
73,89	1,950	1,954	1,952	0,065	15,03	14,83	14,93	14,93
36,95	1,670	1,741	1,781	0,065	27,60	24,41	22,62	24,88
A _{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC ₂₅ (µg/mL)					146,12	148,58	142,94	145,88 ± 2,83
Биомаса 21 дан СРБ								
1477,83	0,388	0,359	0,370	0,096	63,05	66,76	65,28	65,03
1182,27	0,409	0,455	0,446	0,080	58,41	52,57	53,76	54,91
886,70	1,546	1,561	1,471	0,070	33,41	32,74	36,81	34,32
443,35	2,407	2,281	2,364	0,066	-5,55	0,18	-3,60	-2,99
221,67	1,954	1,982	1,949	0,067	14,94	13,68	15,18	14,60
110,84	2,076	2,098	2,040	0,073	9,67	8,67	11,29	9,88
11,08	1,954	2,098	1,949	0,075	15,26	8,76	15,50	13,18
1477,83	0,388	0,359	0,370	0,096	63,05	66,76	65,28	65,03
A _{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790

Јована Мишковић
Докторска дисертација

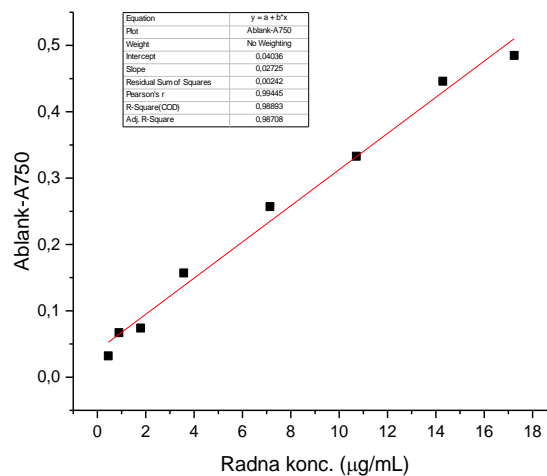
IC ₂₅ (µg/mL)					812,94	757,74	654,01	785,34 ± 39,03
Биомаса 28 дана СРБ								
1477,83	1,717	1,820	1,811	0,100	-112,95	-117,75	-116,51	-115,73
1182,27	0,314	0,340	0,333	0,108	72,05	70,66	71,59	71,44
886,70	0,430	0,421	0,478	0,077	53,63	56,41	49,22	53,08
591,13	0,516	0,458	0,513	0,087	48,21	52,95	46,06	49,07
295,57	0,483	0,481	0,392	0,071	51,84	48,16	59,39	53,13
147,78	1,588	1,557	1,468	0,072	31,64	33,03	37,04	33,90
73,89	1,867	1,681	1,876	0,064	18,73	27,13	18,32	21,39
36,95	1,955	1,839	1,899	0,065	14,80	20,05	17,34	17,40
A _{kontrola}	0,444	0,763	0,816	0,791				0,790
IC ₂₅ (µg/mL)					126,14	64,97	98,25	112,19 ± 19,73

8.2.3. Неутрализација ABTS радикала

Табела 8.7. Калибрациона крива тролокса (Т)

Почетна конц. Т ($\mu\text{g/mL}$)	Радна конц. Т ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A _{sr} -A _{kor} (750 nm)	Аконачно A _{kontrola} -A ₇₅₀
500	17,24	0,044	0,048	0,045	0,046	0,038	0,008	0,485
400	14,29	0,088	0,038	0,037	0,088	0,041	0,047	0,446
300	10,71	0,277	0,188	0,184	0,200	0,040	0,160	0,333
200	7,14	0,294	0,253	0,278	0,275	0,039	0,236	0,257
100	3,57	0,409	0,382	0,365	0,385	0,049	0,336	0,157
50	1,79	0,443	0,452	0,486	0,460	0,041	0,419	0,074
25	0,89	0,489	0,486	0,424	0,466	0,040	0,426	0,067
12,5	0,45	0,497	0,424	0,502	0,500	0,039	0,461	0,032
A _{kontrola} (EtOH)	/	0,511	0,513	0,512	0,436	/	/	0,493

График 8.14. Калибрациона крива за одређивање капацитета „хватања“ ABTS радикала (зависност очитане апсорбанце од концентрације тролокса)



Табела 8.8. Неутрализација АВТС радикала етанолним и полисахаридним екстрактима гљиве *S. commune* Fr.

Екстракт	Радна конц. Т ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A _{kontrola} - A ₇₅₀	Очитана конц. Т ($\mu\text{g/mL}$)	mg ек. Т/g с.м.	Средња вредност ± СД (mg ек. Т/g с.м.)
Филтрат 7 дана ИТА										
ПСХ	961,538	0,281	0,327	0,332	0,313	0,062	0,347	6,390	7,40	6,64 ± 0,66
	384,615	0,352	0,400	0,403	0,385	0,087	0,299	5,297	6,31	
	192,308	0,401	0,366	0,413	0,393	0,057	0,261	4,422	6,21	
ЕТ	1923,08	0,108	0,147	0,105	0,120	0,060	0,489	9,63	5,15	5,01 ± 0,28
	961,54	0,068	0,063	0,064	0,065	0,056	0,540	10,80	4,68	
	480,77	0,065	0,075	0,061	0,067	0,070	0,553	11,09	5,19	
Филтрат 14 дана ИТА										
ПСХ	961,5385	0,207	0,281	0,267	0,251	0,066	0,412	7,881	9,26	8,20 ± 0,94
	384,6154	0,263	0,376	0,297	0,312	0,052	0,338	6,174	7,50	
	192,3077	0,330	0,346	0,376	0,350	0,051	0,299	5,278	7,83	
ЕТ	1923,08	0,151	0,130	0,084	0,122	0,056	0,484	9,51	4,59	4,95 ± 0,41
	961,54	0,075	0,058	0,038	0,057	0,048	0,540	10,80	4,85	
	480,77	0,059	0,059	0,063	0,060	0,079	0,568	11,44	5,40	
Филтрат 21 дан ИТА										
ПСХ	961,538	0,385	0,363	0,407	0,385	0,094	0,307	5,469	5,69	5,69 ± 0,52
	384,615	0,471	0,447	0,475	0,464	0,050	0,184	2,661	6,21	
	192,308	0,476	0,507	0,528	0,504	0,046	0,140	1,659	5,17	
ЕТ	1923,08	0,249	0,218	0,218	0,228	0,053	0,374	7,00	5,15	5,27 ± 0,22
	961,54	0,106	0,108	0,075	0,096	0,058	0,511	10,13	5,12	
	480,77	0,110	0,060	0,073	0,081	0,050	0,518	10,30	5,52	
Филтрат 28 дана ИТА										
ПСХ	961,538	0,470	0,418	0,526	0,471	0,061	0,188	2,749	2,88	2,86 ± 1,30
	384,615	0,558	0,531	0,547	0,545	0,048	0,101	0,749	4,14	
	192,308	0,529	0,549	0,563	0,547	0,049	0,100	0,744	1,55	
ЕТ	1923,08	0,254	0,330	0,247	0,277	0,053	0,326	5,90	3,34	3,38 ± 0,06
	961,54	0,094	0,097	0,104	0,098	0,080	0,531	10,60	2,43	
	480,77	0,065	0,067	0,136	0,090	0,047	0,507	10,04	3,43	
Биомаса 7 дана ИТА										

ПСХ	961,538	0,292	0,401	0,420	0,371	0,058	0,285	4,959	7,02	5,16 ± 1,63
	384,615	0,518	0,464	0,610	0,531	0,054	0,121	1,223	4,45	
	192,308	0,442	0,475	0,473	0,463	0,050	0,184	2,664	4,00	
ЕТ	1923,08	0,079	0,073	0,159	0,103	0,040	0,485	9,547	5,26	5,29 ± 0,05
	961,54	0,050	0,067	0,061	0,059	0,041	0,531	10,598	5,33	
	480,77	0,063	0,057	0,055	0,058	0,056	0,547	10,970	4,31	
Биомаса 14 дана ИТА										
ПСХ	961,538	0,578	0,435	0,516	0,510	0,048	0,136	1,562	0,00	1,63 ± 1,71
	384,615	0,544	0,536	0,567	0,549	0,049	0,098	0,684	3,41	
	192,308	0,522	0,507	0,525	0,518	0,049	0,130	1,411	1,48	
ЕТ	1923,08	0,094	0,106	0,093	0,098	0,054	0,505	10,005	5,24	5,20 ± 0,08
	961,54	0,090	0,084	0,061	0,079	0,062	0,533	10,639	5,11	
	480,77	0,063	0,059	0,064	0,062	0,055	0,542	10,846	5,26	
Биомаса 21 дан ИТА										
ПСХ	961,538	0,315	0,291	0,347	0,317	0,102	0,383	7,203	7,57	7,49 ± 0,67
	384,615	0,398	0,403	0,415	0,405	0,058	0,250	4,168	8,12	
	192,308	0,471	0,450	0,462	0,461	0,058	0,195	2,903	6,78	
ЕТ	1923,08	0,119	0,101	0,106	0,109	0,058	0,498	9,841	5,91	5,84 ± 0,06
	961,54	0,061	0,069	0,071	0,067	0,076	0,558	11,222	5,81	
	480,77	0,067	0,062	0,061	0,063	0,080	0,566	11,402	5,78	
Биомаса 28 дана ИТА										
ПСХ	961,538	0,502	0,506	0,533	0,514	0,199	0,283	4,919	5,38	5,12 ± 0,39
	384,615	0,488	0,481	0,543	0,504	0,088	0,182	2,615	5,31	
	192,308	0,514	0,461	0,473	0,482	0,056	0,172	2,382	4,67	
ЕТ	1923,08	0,121	0,138	0,106	0,121	0,048	0,476	9,330	4,86	4,85 ± 0,19
	961,54	0,075	0,069	0,067	0,070	0,060	0,539	10,781	4,66	
	480,77	0,063	0,079	0,065	0,069	0,055	0,535	10,693	5,03	
Филтрат 7 дана СРБ										
ПСХ	961,538	0,340	0,341	0,330	0,337	0,057	0,177	2,493	2,53	2,60 ± 0,14
	384,615	0,350	0,338	0,334	0,341	0,057	0,173	2,411	2,50	
	192,308	0,342	0,360	0,358	0,353	0,048	0,152	1,919	2,76	
ЕТ	1923,08	0,249	0,239	0,126	0,205	0,059	0,427	8,21	3,74	3,80 ± 0,08
	961,54	0,101	0,113	0,092	0,102	0,054	0,525	10,45	3,86	
	480,77	0,089	0,079	0,061	0,076	0,064	0,559	11,24	5,21	
Филтрат 14 дана СРБ										
ПСХ	961,538	0,163	0,154	0,170	0,161	0,084	0,379	7,115	7,38	7,40 ± 0,19
	384,615	0,252	0,255	0,277	0,261	0,059	0,255	4,273	7,59	

	192,308	0,339	0,337	0,344	0,340	0,049	0,165	2,231	7,21	
ЕТ	1923,08	0,303	0,369	0,207	0,293	0,063	0,342	6,27	3,14	3,26 ±
	961,54	0,116	0,104	0,083	0,110	0,059	0,521	10,36	2,36	0,96
	480,77	0,059	0,067	0,071	0,066	0,078	0,584	11,82	4,28	
	Филтрат 21 дан СРБ									
ПСХ	961,538	0,124	0,166	0,119	0,136	0,068	0,388	7,326	7,93	7,62 ±
	384,615	0,172	0,206	0,226	0,202	0,058	0,313	5,612	6,90	0,62
	192,308	0,319	0,250	0,256	0,275	0,048	0,230	3,720	8,02	
ЕТ	1923,08	0,182	0,189	0,141	0,171	0,057	0,459	8,94	4,51	4,65 ±
	961,54	0,127	0,140	0,103	0,123	0,048	0,496	9,80	4,43	0,31
	480,77	0,074	0,066	0,060	0,067	0,042	0,547	10,96	5,00	
	Филтрат 28 дана СРБ									
ПСХ	961,538	0,333	0,490	0,365	0,396	0,097	0,158	2,051	3,62	3,25 ±
	384,615	0,465	0,427	0,408	0,433	0,055	0,078	0,238	-0,12	1,98
	192,308	0,240	0,439	0,415	0,365	0,085	0,178	2,513	2,88	
ЕТ	1923,08	0,267	0,196	0,278	0,247	0,054	0,379	7,11	3,46	3,40 ±
	961,54	0,098	0,151	0,145	0,131	0,085	0,526	10,48	4,30	0,09
	480,77	0,067	0,079	0,125	0,090	0,057	0,539	10,78	3,33	
	Биомаса 7 дана СРБ									
ПСХ	961,538	0,148	0,128	0,162	0,146	0,084	0,395	7,489	7,74	7,78 ±
	384,615	0,169	0,237	0,165	0,190	0,056	0,323	5,837	8,21	0,41
	192,308	0,246	0,266	0,263	0,258	0,050	0,249	4,134	7,40	
ЕТ	1923,08	0,054	0,063	0,120	0,079	0,060	0,553	11,09	6,06	6,01 ±
	961,54	0,050	0,061	0,052	0,054	0,048	0,566	11,40	5,96	0,07
	480,77	0,090	0,089	0,098	0,092	0,063	0,542	10,85	5,28	
	Биомаса 14 дана СРБ									
ПСХ	961,538	0,353	0,348	0,319	0,339833	0,084	0,201	3,038	2,86	3,17 ±
	384,615	0,365	0,370	0,368	0,3675	0,056	0,145	1,765	2,98	0,44
	192,308	0,368	0,365	0,375	0,369233	0,054	0,142	1,691	3,67	
ЕТ	1923,08	0,314	0,305	0,297	0,305	0,055	0,322	5,81	2,92	3,02 ±
	961,54	0,108	0,114	0,129	0,117	0,074	0,530	10,56	3,02	0,10
	480,77	0,063	0,055	0,060	0,059	0,060	0,572	11,54	3,12	
	Биомаса 21 дан СРБ									
ПСХ	961,538	0,368	0,379	0,354	0,367	0,074	0,164	2,207	2,26	2,30 ±
	384,615	0,387	0,387	0,392	0,388	0,052	0,121	1,205	2,00	0,31
	192,308	0,389	0,377	0,395	0,387	0,053	0,123	1,259	2,62	
ЕТ	1923,08	0,103	0,091	0,173	0,122	0,074	0,524	10,44	5,66	

	961,54	0,057	0,063	0,065	0,062	0,087	0,598	12,12	5,80	5,43 ±
	480,77	0,060	0,059	0,071	0,063	0,084	0,593	12,02	4,82	0,53
Биомаса 28 дана СРБ										
ПСХ	961,538	0,402	0,372	0,382	0,385	0,086	0,158	2,055	1,76	2,14 ± 0,35
	384,615	0,387	0,360	0,326	0,358	0,053	0,152	1,920	2,45	
	192,308	0,371	0,417	0,470	0,419	0,060	0,098	0,691	2,22	
ЕТ	1923,08	0,115	0,115	0,081	0,103	0,061	0,530	10,57	5,36	5,49 ± 0,23
	961,54	0,063	0,062	0,087	0,071	0,051	0,552	11,07	5,36	
	480,77	0,059	0,062	0,060	0,060	0,068	0,579	11,70	5,76	

Табела 8.9. Неутрализација АВТС радикала метанолним екстрактима биљке *Pisum sativum* L. у оптималним условима и условима стреса – суше након биопрајминга са езо- и интраполисахаридима

Екстракт	Радна конц.Т (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A _{kontrola} - A ₇₅₀	Очитана конц. Т (µg/mL)	mg ек. T/g с.м.	Средња вредност ± СД (mg ек. T/g с.м.)
Контрола, оптимални услови										
НД	666,67	0,317	0,278	0,286	0,294	0,049	0,512	5,07	15,22	14,06 ± 1,13
	333,33	0,525	0,543	0,558	0,542	0,049	0,264	4,66	13,99	
	166,67	0,659	0,630	0,657	0,649	0,053	0,161	4,32	12,96	
К	666,67	0,544	0,508	0,520	0,524	0,050	0,269	0,52	3,13,	4,09 ± 0,84
	333,33	0,627	0,631	0,632	0,630	0,047	0,160	0,77	4,64	
	166,67	0,722	0,711	0,712	0,715	0,047	0,075	0,75	4,50	
Хидропрајминг, оптимални услови										
НД	666,67	0,338	0,415	0,432	0,395	0,055	0,403	4,41	13,23	11,01 ± 2,03
	333,33	0,554	0,593	0,612	0,586	0,049	0,206	3,52	10,56	
	166,67	0,621	0,629	0,668	0,639	0,046	0,150	3,08	9,25	
К	666,67	0,483	0,491	0,502	0,492	0,047	0,298	5,99	8,98	8,68 ± 0,33
	333,33	0,681	0,680	0,656	0,672	0,050	0,121	5,81	8,71	
	166,67	0,738	0,741	0,749	0,743	0,049	0,049	5,56	8,33	
ЕПСХ ИТА, оптимални услови										
НД	666,67	0,442	0,440	0,442	0,441	0,060	0,362	7,23	10,84	10,86 ± 0,04
	333,33	0,490	0,485	0,504	0,493	0,050	0,300	7,27	10,91	
	166,67	0,692	0,668	0,685	0,682	0,050	0,111	7,23	10,84	

К	666,67	0,515	0,506	0,515	0,512	0,049	0,280	5,30	7,96	8,06 ± 0,18
	333,33	0,657	0,603	0,665	0,642	0,050	0,151	5,51	8,26	
	166,67	0,701	0,685	0,728	0,705	0,064	0,102	5,30	7,96	
ИПСХ ИТА, оптимални услови										
НД	666,67	0,288	0,254	0,267	0,270	0,066	0,539	10,89	16,33	16,96 ± 0,59
	333,33	0,559	0,578	0,597	0,578	0,051	0,216	11,66	17,50	
	166,67	0,412	0,576	0,663	0,550	0,048	0,241	11,37	17,05	
К	666,67	0,608	0,565	0,493	0,555	0,048	0,236	-0,14	-0,43	3,69 ± 1,94
	333,33	0,754	0,714	0,674	0,714	0,050	0,079	0,77	2,32	
	166,67	0,768	0,775	0,780	0,774	0,048	0,017	1,69	5,06	
ЕПСХ СРБ, оптимални услови										
НД	666,67	0,046	0,048	0,046	0,047	0,051	0,762	7,06	21,18	21,02 ± 0,18
	333,33	0,136	0,141	0,138	0,138	0,051	0,669	6,94	20,82	
	166,67	0,236	0,241	0,239	0,239	0,051	0,569	7,02	21,06	
К	666,67	0,090	0,093	0,087	0,090	0,050	0,703	6,59	19,76	19,06 ± 0,61
	333,33	0,163	0,180	0,177	0,173	0,057	0,627	6,20	18,61	
	166,67	0,238	0,272	0,274	0,261	0,051	0,532	6,27	18,80	
ИПСХ СРБ, оптимални услови										
НД	666,67	0,049	0,049	0,048	0,049	0,055	0,749	7,99	23,97	23,99 ± 0,41
	333,33	0,093	0,087	0,099	0,093	0,049	0,699	8,14	24,41	
	166,67	0,199	0,177	0,206	0,194	0,048	0,597	7,87	23,60	
К	666,67	0,051	0,050	0,051	0,051	0,057	0,749	5,57	33,42	33,55 ± 0,18
	333,33	0,072	0,073	0,075	0,073	0,049	0,719	5,63	33,75	
	166,67	0,198	0,196	0,198	0,197	0,048	0,594	5,58	33,48	
Контрола, суша										
НД	666,67	0,231	0,173	0,201	0,202	0,061	0,602	6,79	20,37	24,47 ± 3,63
	333,33	0,454	0,353	0,376	0,394	0,053	0,402	9,10	27,31	
	166,67	0,566	0,527	0,491	0,528	0,051	0,266	8,58	25,73	
К	666,67	0,343	0,301	0,302	0,315	0,052	0,494	7,02	21,06	20,88 ± 0,26
	333,33	0,441	0,448	0,442	0,444	0,05	0,363	6,86	20,58	
	166,67	0,644	0,574	0,641	0,620	0,048	0,185	7,00	20,99	
Хидропрајминг, суша										
НД	666,67	0,264	0,227	0,24	0,244	0,063	0,579	6,91	20,72	21,84 ± 1,25
	333,33	0,45	0,414	0,437	0,434	0,054	0,380	7,73	23,19	
	166,67	0,549	0,52	0,545	0,538	0,049	0,271	7,20	21,61	
К	666,67	0,418	0,379	0,373	0,390	0,053	0,423	5,39	16,19	22,18 ± 6,08
	333,33	0,509	0,332	0,424	0,422	0,047	0,385	9,44	28,34	

	166,67	0,616	0,631	0,532	0,593	0,049	0,216	7,34	22,02	
ЕПСХ ИТА, суша										
НД	666,67	0,336	0,336	0,335	0,336	0,052	0,473	8,21	24,63	19,14 ± 4,76
	333,33	0,389	0,512	0,506	0,469	0,05	0,338	5,39	16,19	
	166,67	0,628	0,62	0,618	0,622	0,051	0,186	5,53	16,60	
К	666,67	0,390	0,357	0,378	0,375	0,053	0,627	11,76	17,63	19,98 ± 2,11
	333,33	0,485	0,478	0,525	0,496	0,051	0,413	13,72	20,59	
	166,67	0,61	0,617	0,641	0,623	0,049	0,258	14,48	21,72	
ИПСХ ИТА, суша										
НД	666,67	0,206	0,174	0,18	0,187	0,055	0,611	12,51	18,77	19,43 ± 0,58
	333,33	0,384	0,385	0,314	0,361	0,049	0,431	13,24	19,86	
	166,67	0,576	0,519	0,555	0,550	0,047	0,240	13,11	19,66	
К	666,67	0,336	0,336	0,335	0,336	0,052	0,473	8,21	24,63	19,14 ± 4,76
	333,33	0,389	0,512	0,506	0,469	0,05	0,338	5,39	16,19	
	166,67	0,628	0,62	0,618	0,622	0,051	0,186	5,53	16,60	
ЕПСХ СРБ, суша										
НД	666,67	0,046	0,048	0,048	0,047	0,055	0,751	6,03	36,15	36,93 ± 1,01
	333,33	0,091	0,068	0,064	0,074	0,051	0,720	6,35	38,08	
	166,67	0,183	0,169	0,180	0,178	0,053	0,618	6,09	36,57	
К	666,67	0,081	0,049	0,067	0,066	0,051	0,728	6,24	18,71	19,70 ± 0,86
	333,33	0,170	0,149	0,147	0,155	0,049	0,636	6,71	20,12	
	166,67	0,298	0,274	0,286	0,286	0,051	0,508	6,76	20,28	
ИПСХ СРБ, суша										
НД	666,67	0,049	0,051	0,048	0,049	0,053	0,746	8,90	53,42	39,99 ± 2,69
	333,33	0,049	0,050	0,047	0,048	0,052	0,747	6,98	41,89	
	166,67	0,054	0,138	0,166	0,120	0,050	0,673	6,35	38,09	
К	666,67	0,053	0,050	0,051	0,051	0,054	0,746	5,00	29,98	30,50 ± 0,56
	333,33	0,134	0,118	0,126	0,126	0,048	0,665	5,02	30,10	
	166,67	0,224	0,223	0,217	0,222	0,049	0,570	5,15	30,90	

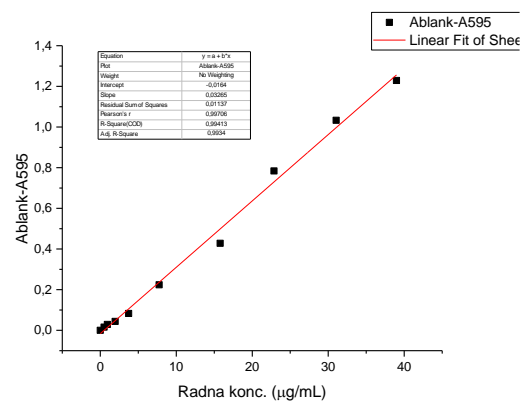
НД – надземни део; К – корен

8.2.4. Детерминација редукционог потенцијала (FRAP есеј)

Табела 8.10. Калибрациона крива аскорбинске киселине (АК)

Почетна конц. АК ($\mu\text{g/mL}$)	Радна конц. АК ($\mu\text{g/mL}$)	A_1	A_2	A_3	A_{sr}	A_{kor}	A $A_{\text{sr}} - A_{\text{kontrola}}$ (595 nm)
0	0,00	0,058	0,078	0,092	0,076	0,044	0,00
12,5	0,50	0,114	0,097	0,098	0,103	0,045	0,016
25	0,94	0,125	0,115	0,107	0,115667	0,047	0,029
50	1,96	0,138	0,128	0,127	0,131	0,044	0,044
100	3,74	0,148	0,187	0,175	62,441	0,040	0,083
200	7,75	0,345	0,298	0,291	0,311333	0,047	0,224
400	15,78	0,498	0,520	0,528	0,515333	0,041	0,428
600	22,87	0,851	0,882	0,880	0,871	0,048	0,784
800	31,04	1,158	1,100	1,101	1,119667	0,050	1,033
1000	38,98	1,287	1,330	1,331	1,316	0,047	1,229
A_{kontrola} (H_2O)	/	0,087	0,088	0,087	/	/	0,087

График 8.15. Калибрациона крива за одређивање редукционог капацитета испитиваних екстраката (зависност очитане апсорбанце од концентрације аскорбинске киселине)



Табела 8.11. Редукциони потенцијал испитиваних етанолних и полисахаридних екстраката гљиве *S. commune* Fr.

Екстракт	Радна конц. АК ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{Sr}	A _{kor}	A _{Sr} - A _{kor}	Очитана конц. АК ($\mu\text{g/mL}$)	mg ек. АК/g с.м.	Средња вредност \pm СД (mg ек. АК/g с.м.)
Филтрат 7 дана ИТА										
ПСХ	970,8738	1,306	0,604	0,473	0,794	0,120	0,675	25,366	69,80	65,11 \pm 6,27
	485,4369	1,249	1,118	1,224	1,197	0,363	0,834	65,086	57,99	
	242,7184	0,591	0,613	0,660	0,621	0,122	0,499	69,780	67,55	
ЕТ	1937,98	1,591	2,167	2,300	2,019	0,048	1,971	81,380	40,12	42,58 \pm 3,47
	968,99	1,047	1,156	0,927	1,043	0,047	0,997	38,719	45,03	
	484,50	0,501	0,551	0,544	0,532	0,042	0,490	16,545	34,72	
Филтрат 14 дана ИТА										
ПСХ	970,8738	0,704	0,602	0,519	0,608	0,071	0,537	19,170	77,55	65,73 \pm 12,11
	485,4369	1,045	0,951	0,780	0,925	0,073	0,852	66,719	68,99	
	242,7184	0,713	0,355	0,424	0,497	0,081	0,416	54,870	53,66	
ЕТ	1937,98	3,304	3,758	3,576	3,546	0,057	3,489	147,817	97,06	99,00 \pm 2,73
	968,99	2,310	2,396	2,260	2,322	0,049	2,272	94,574	100,93	
	484,50	0,873	0,836	1,285	0,998	0,044	0,954	36,880	94,81	
Филтрат 21 дан ИТА										
ПСХ	970,8738	1,414	1,436	1,390	1,413	0,259	1,154	46,993	81,88	82,96 \pm 0,94
	485,4369	1,201	1,218	1,220	1,213	0,181	1,032	82,961	83,42	
	242,7184	0,726	0,575	0,603	0,635	0,069	0,566	81,913	83,60	
ЕТ	1937,98	3,246	3,424	3,384	3,351	0,050	3,301	139,592	81,79	91,65 \pm 0,96
	968,99	1,971	2,174	2,204	2,116	0,048	2,068	85,628	90,98	
	484,50	1,083	1,058	1,234	1,125	0,046	1,079	42,315	92,33	
Филтрат 28 дана ИТА										
ПСХ	970,8738	0,253	0,265	0,244	0,254	0,064	0,380	3,540	35,89	28,44 \pm 7,72
	485,4369	0,657	0,581	0,487	0,575	0,148	0,427	28,430	28,95	
	242,7184	0,313	0,302	0,309	0,308	0,073	0,299	22,157	20,47	
ЕТ	1937,98	2,447	2,403	2,379	2,409	0,051	2,358	98,334	62,47	47,82 \pm 5,28
	968,99	1,543	1,301	1,136	1,327	0,048	1,279	51,070	51,55	
	484,50	0,901	0,728	0,786	0,805	0,044	0,761	28,425	44,09	
Биомаса 7 дана ИТА										

ПСХ	970,8738	1,179	1,030	1,126	1,112	0,112	0,999	40,015	43,06	40,03 ± 3,41
	485,4369	0,492	0,484	0,494	0,490	0,071	0,419	27,726	36,34	
	242,7184	0,385	0,328	0,385	0,366	0,065	0,301	34,115	40,67	
ЕТ	1937,98	0,154	0,149	0,149	0,151	0,041	0,109	-0,112	62,15	66,39 ± 3,84
	968,99	0,148	0,149	0,150	0,149	0,043	0,106	-0,258	67,41	
	484,50	0,158	0,149	0,142	0,150	0,042	0,108	-0,172	69,63	
Биомаса 14 дана ИТА										
ПСХ	970,8738	0,334	0,107	0,320	0,254	0,154	0,100	-0,536	-0,72	6,49 ± 7,40
	485,4369	0,152	0,174	0,290	0,205	0,048	0,158	4,104	1,26	
	242,7184	0,155	0,160	0,143	0,153	0,055	0,098	-2,577	11,72	
ЕТ	1937,98	3,092	3,237	3,465	3,265	0,052	3,213	135,744	83,52	81,30 ± 1,98
	968,99	2,007	1,922	1,943	1,957	0,046	1,912	78,774	79,71	
	484,50	1,102	0,147	1,187	0,812	0,044	0,768	28,724	80,66	
Биомаса 21 дан ИТА										
ПСХ	970,8738	1,398	1,378	1,335	1,370	0,331	1,039	41,811	90,91	79,12 ± 10,77
	485,4369	1,086	1,015	1,001	1,034	0,209	0,826	64,347	76,66	
	242,7184	0,833	0,754	0,717	0,768	0,218	0,550	79,069	69,80	
ЕТ	1937,98	0,829	0,791	0,844	0,821	0,047	0,774	28,984	14,49	14,22 ± 1,32
	968,99	0,477	0,439	0,496	0,470	0,044	0,427	13,774	12,78	
	484,50	0,343	0,328	0,352	0,341	0,042	0,299	8,167	15,37	
Биомаса 28 дана ИТА										
ПСХ	970,8738	1,017	1,150	0,840	1,002	0,622	0,380	12,087	33,01	33,67 ± 5,35
	485,4369	0,883	0,328	0,595	0,602	0,175	0,427	28,439	39,32	
	242,7184	0,430	0,465	0,406	0,434	0,135	0,299	33,659	28,68	
ЕТ	1937,98	1,573	1,611	1,580	1,588	0,058	1,530	62,090	33,40	32,46 ± 1,27
	968,99	0,898	0,888	0,845	0,877	0,047	0,831	31,454	32,96	
	484,50	0,573	0,555	0,576	0,568	0,045	0,523	17,978	31,02	
Филтрат 7 дана СРБ										
ПСХ	970,8738	0,169	0,166	0,154	0,163	0,049	0,114	45,480	0,35	0,28 ± 0,09
	485,4369	0,134	0,110	0,125	0,123	0,046	0,077	61,547	0,22	
	242,7184	0,106	0,109	0,105	0,107	0,045	0,062	98,827	-0,33	
ЕТ	1937,98	3,056	2,937	3,171	3,054	0,053	3,001	126,469	65,19	61,81 ± 4,78
	968,99	1,601	1,451	1,757	1,603	0,046	1,557	63,266	58,43	
	484,50	0,812	0,916	1,097	0,942	0,041	0,901	34,535	72,25	
Филтрат 14 дана СРБ										
ПСХ	970,8738	0,356	0,497	0,357	0,403	0,076	0,327	130,760	7,55	9,69 ± 3,67
	485,4369	0,246	0,238	0,213	0,232	0,051	0,181	144,880	13,93	

	242,7184	0,185	0,228	0,181	0,198	0,056	0,142	227,787	7,59	
ЕТ	1937,98	3,973	3,942	6,000	3,958	0,065	3,892	165,487	76,80	107,86 ±
	968,99	1,864	2,752	2,351	2,323	0,052	2,270	94,485	116,92	12,81
	484,50	0,967	1,307	1,136	1,136	0,046	1,090	42,827	98,80	
Филтрат 21 дан СРБ										
ПСХ	970,8738	1,423	1,525	1,493	1,480	0,102	1,378	551,213	54,52	57,10 ±
	485,4369	0,743	0,705	0,674	0,707	0,071	0,637	509,547	59,12	2,35
	242,7184	0,494	0,448	0,409	0,450	0,055	0,396	632,907	57,67	
ЕТ	1937,98	3,396	3,527	3,407	3,443	0,060	3,384	143,211	92,47	89,97 ±
	968,99	2,208	2,790	2,097	2,365	0,049	2,316	96,482	118,77	3,53
	484,50	1,231	1,489	1,349	1,356	0,047	1,310	52,429	87,47	
Филтрат 28 дана СРБ										
ПСХ	970,8738	0,332	0,327	0,278	0,312	0,104	0,209	83,453	5,23	4,36 ±
	485,4369	0,181	0,180	0,156	0,172	0,053	0,119	95,440	5,05	1,36
	242,7184	0,108	0,130	0,100	0,113	0,046	0,067	106,667	2,80	
ЕТ	1937,98	3,518	6,000	3,736	3,627	0,051	3,575	151,608	76,60	80,28 ±
	968,99	1,854	1,969	1,984	1,936	0,047	1,889	77,786	81,77	3,21
	484,50	1,325	1,223	1,104	1,217	0,047	1,170	46,306	82,46	
Биомаса 7 дана СРБ										
ПСХ	970,8738	0,641	0,683	0,609	0,644	0,069	0,575	230,120	20,74	20,89 ±
	485,4369	0,250	0,265	0,171	0,229	0,065	0,164	131,360	22,64	1,67
	242,7184	0,131	0,168	0,136	0,145	0,047	0,098	157,333	19,30	
ЕТ	1937,98	0,608	0,719	0,659	0,662	0,044	0,618	22,166	12,03	11,44 ±
	968,99	0,462	0,516	0,502	0,493	0,046	0,448	14,707	11,82	0,84
	484,50	0,333	0,292	0,340	0,322	0,040	0,282	7,421	10,48	
Биомаса 14 дана СРБ										
ПСХ	970,8738	0,078	0,424	0,408	0,303	0,092	0,211	4,340	-5,69	9,55 ±
	485,4369	0,081	0,093	0,101	0,092	0,043	0,049	-2,772	9,91	0,51
	242,7184	0,090	0,075	0,084	0,083	0,044	0,039	-3,208	9,19	
ЕТ	1937,98	1,180	2,778	2,896	2,285	0,058	2,226	92,551	5,80	5,99 ±
	968,99	1,623	1,910	1,633	1,722	0,203	1,519	61,575	6,00	0,20
	484,50	0,731	1,107	1,108	0,982	0,046	0,936	36,057	6,19	
Биомаса 21 дан СРБ										
ПСХ	970,8738	0,273	0,340	0,267	0,293	0,057	0,236	5,436	4,69	5,61 ±
	485,4369	0,234	0,414	0,253	0,300	0,091	0,210	4,281	7,71	1,83
	242,7184	0,101	0,104	0,102	0,102	0,052	0,050	-2,711	4,42	
ЕТ	1937,98	1,382	1,461	1,653	1,498	0,054	1,445	58,345	11,23	

	968,99	0,839	1,017	0,905	0,920	0,046	0,874	33,373	11,52	10,77 ±
	484,50	0,554	0,606	0,525	0,562	0,046	0,516	17,686	9,57	1,05
Биомаса 28 дана СРБ										
ПСХ	970,8738	0,320	0,380	0,247	0,316	0,248	0,068	-1,945	-1,80	0,90 ± 1,91
	485,4369	0,146	0,143	0,140	0,143	0,056	0,087	-1,081	0,90	
	242,7184	0,132	0,138	0,101	0,124	0,065	0,059	-2,323	-5,09	
ЕТ	1937,98	1,143	1,527	1,364	1,345	0,056	1,289	51,513	10,64	10,91 ± 0,46
	968,99	0,507	0,989	0,729	0,741	0,048	0,693	25,455	10,64	
	484,50	0,332	0,550	0,522	0,468	0,047	0,421	13,516	11,44	

Табела 8.12. Редукциони потенцијал испитиваних метанолних екстраката грашка *Pisum sativum* L. у оптималним условима и условима стреса – суше након биопрајминга са езго- и интраполисахаридима

Екстракт	Радна конц. АК (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A _{sr} - A _{kor}	Очитана конц. АК (µg/mL)	mg ек. АК/g с.м.	Средња вредност ± СД (mg ек. АК/g с.м.)
Контрола, оптимални услови										
НД	775,19	0,580	0,569	0,547	0,566	0,049	0,517	8,04	20,74	24,93 ± 4,49
	387,60	0,340	0,372	0,419	0,377	0,044	0,333	9,44	24,36	
	193,80	0,231	0,253	0,266	0,250	0,045	0,205	11,50	29,67	
К	775,19	0,403	0,465	0,446	0,438	0,044	0,394	4,41	22,73	26,56 ± 3,35
	387,60	0,366	0,382	0,339	0,362	0,044	0,318	5,61	28,96	
	193,80	0,256	0,284	0,279	0,273	0,043	0,230	5,42	27,97	
Хидропрајминг, оптимални услови										
НД	775,19	0,548	0,578	0,565	0,564	0,055	0,509	9,51	24,54	28,30 ± 1,17
	387,60	0,375	0,401	0,416	0,397	0,046	0,351	10,65	27,47	
	193,80	0,245	0,284	0,266	0,265	0,047	0,217	11,29	29,13	
К	775,19	0,301	0,308	0,339	0,316	0,047	0,269	6,21	8,01	8,21 ± 0,28
	387,60	0,305	0,333	0,310	0,316	0,046	0,269	6,52	8,41	
	193,80	0,276	0,292	0,253	0,274	0,045	0,229	7,87	10,15	
ЕПСХ ИТА, оптимални услови										
НД	775,19	0,497	0,506	0,517	0,507	0,062	0,445	14,16	18,27	18,80 ± 0,56
	387,60	0,361	0,426	0,342	0,376	0,049	0,328	14,53	18,74	
	193,80	0,264	0,262	0,258	0,261	0,045	0,216	15,02	19,38	

К	775,19	0,301	0,354	0,351	0,335	0,047	0,288	6,22	8,03	10,93 ± 0,12
	387,60	0,266	0,299	0,298	0,288	0,044	0,244	8,53	11,01	
	166,67	0,701	0,685	0,728	0,705	0,064	0,161	8,41	10,84	
ИПСХ ИТА, оптимални услови										
НД	775,19	0,533	0,551	0,508	0,530	0,057	0,473	15,90	20,52	20,39 ± 1,23
	387,60	0,346	0,389	0,353	0,363	0,046	0,316	16,70	21,54	
	193,80	0,294	0,315	0,332	0,314	0,051	0,263	14,81	19,10	
К	775,19	0,376	0,341	0,332	0,350	0,043	0,306	5,24	13,51	11,89 ± 1,41
	387,60	0,274	0,252	0,253	0,260	0,043	0,217	4,27	11,00	
	193,80	0,233	0,231	0,222	0,229	0,044	0,185	4,32	11,15	
ЕПСХ СРБ. оптимални услови										
НД	775,19	0,470	0,490	0,520	0,493	0,071	0,423	8,73	22,53	22,90 ± 0,32
	387,60	0,362	0,367	0,366	0,365	0,050	0,315	8,97	23,14	
								8,93	23,03	
К	775,19	0,399	0,446	0,445	0,430	0,055	0,375	8,55	22,07	22,36 ± 0,41
	387,60	0,359	0,364	0,346	0,357	0,052	0,305	8,78	22,65	
								7,98	20,59	
ИПСХ СРБ, оптимални услови										
НД	775,19	0,484	0,496	0,472	0,484	0,055	0,429	9,75	25,15	25,09 ± 0,08
	387,60	0,385	0,384	0,383	0,384	0,050	0,334	9,74	25,12	
								9,69	25,00	
К	775,19	0,524	0,532	0,551	0,536	0,060	0,476	15,41	19,88	20,54 ± 0,78
	387,60	0,420	0,464	0,431	0,438	0,050	0,389	15,76	20,33	
								16,59	21,40	
Контрола, суша										
НД	775,19	0,514	0,58	0,574	0,556	0,064	775,19	10,64	27,45	25,04 ± 2,27
	387,60	0,415	0,391	0,375	0,394	0,06	387,60	9,59	24,74	
	193,80	0,275	0,272	0,278	0,275	0,056	193,80	8,89	22,93	
К	775,19	0,473	0,453	0,485	0,470	0,051	0,419	7,01	18,07	20,71 ± 3,72
	387,60	0,322	0,331	0,383	0,345	0,05	0,295	7,40	19,09	
	193,80	0,243	0,268	0,294	0,268	0,049	0,219	9,68	24,96	
Хидропрајминг, суша										
НД	775,19	0,48	0,588	0,642	0,570	0,069	0,330	7,40	19,09	21,54 ± 3,49
	387,60	0,342	0,35	0,399	0,364	0,061	0,253	7,75	19,99	
	193,80	0,252	0,269	0,292	0,271	0,046	0,204	9,89	25,53	
К	775,19	0,403	0,364	0,402	0,390	0,06	0,501	6,00	15,48	

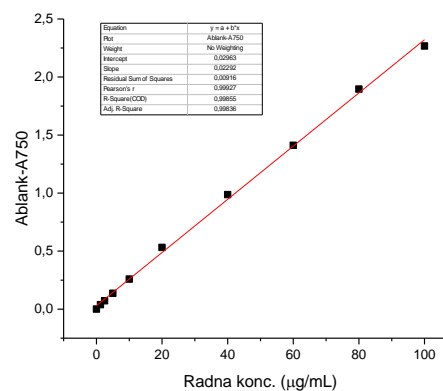
	387,60	0,304	0,317	0,302	0,308	0,055	0,303	6,57	16,94	15,89 ±
	193,80	0,246	0,269	0,285	0,267	0,063	0,225	5,91	15,25	0,92
ЕПСХ ИТА, суша										
	775,19	0,604	0,612	0,571	0,596	0,053	0,543	19,22	24,79	24,32 ±
НД	387,60	0,379	0,381	0,372	0,377	0,047	0,330	19,57	25,24	1,23
	193,80	0,274	0,28	0,286	0,280	0,061	0,219	17,77	22,93	
	775,19	0,386	0,404	0,42	0,403	0,057	0,346	9,50	12,26	13,23 ±
К	387,60	0,301	0,288	0,294	0,294	0,055	0,239	10,29	13,27	0,96
	193,80	0,202	0,203	0,208	0,204	0,064	0,140	10,99	14,18	
ИПСХ ИТА, суша										
	775,19	0,564	0,589	0,603	0,585	0,065	0,520	16,94	21,86	23,06 ±
НД	387,60	0,388	0,361	0,343	0,364	0,061	0,303	18,04	23,27	1,12
	193,80	0,255	0,281	0,263	0,267	0,059	0,208	18,65	24,06	
	775,19	0,398	0,324	0,362	0,361	0,047	0,314	6,39	16,49	14,91 ±
К	387,60	0,307	0,289	0,283	0,293	0,049	0,244	5,60	14,46	1,41
	193,80	0,254	0,236	0,219	0,236	0,06	0,176	5,34	13,78	
ЕПСХ СРБ, суша										
	775,19	0,500	0,538	0,544	0,527	0,057	0,470	14,50	18,70	21,01 ±
НД	387,60	0,368	0,404	0,410	0,394	0,052	0,342	16,17	20,86	0,21
								16,40	21,15	
	775,19	0,459	0,498	0,492	0,483	0,053	0,429	12,84	16,57	18,59 ±
К	387,60	0,382	0,401	0,406	0,396	0,050	0,346	14,54	18,76	0,23
								14,28	18,43	
ИПСХ СРБ, суша										
	775,19	0,515	0,501	0,500	0,505	0,053	0,453	15,34	19,79	19,24 ±
НД	387,60	0,390	0,410	0,368	0,389	0,052	0,338	14,72	18,99	0,48
								14,68	18,94	
	775,19	0,415	0,436	0,453	0,435	0,053	0,382	8,83	22,77	25,96 ±
К	387,60	0,358	0,385	0,388	0,377	0,045	0,332	10,00	25,80	0,23
								10,13	26,13	

8.2.5. Детерминација укупних фенола

Табела 8.13. Калибрациона крива галне киселине (ГК)

Почетна конц. ГК ($\mu\text{g/mL}$)	Радна конц. ГК ($\mu\text{g/mL}$)	A_1	A_2	A_3	A_{sr}	A_{kor}	A $A_{sr}-A_{kontrola}$ (750 nm)
1,0	100	2,356	2,334	2,313	2,334	0,040	2,267
0,8	80	1,918	1,980	1,992	1,963	0,039	1,896
0,6	60	1,459	1,478	1,500	1,479	0,040	1,412
0,4	40	1,065	1,019	1,078	1,054	0,038	0,987
0,2	20	0,587	0,602	0,608	0,599	0,040	0,532
0,1	10	0,310	0,341	0,327	0,326	0,039	0,259
0,05	5	0,207	0,201	0,204	0,204	0,040	0,137
0,025	2,5	0,136	0,135	0,145	0,139	0,041	0,072
0,0125	1,25	0,105	0,106	0,108	0,106	0,043	0,039
0	0	0,071	0,066	0,068	0,068	0	0,001
$A_{kontrola}$ (H_2O)	/	0,068	0,065	0,069	0,067	/	0,067

График 8.16. Калибрациона крива за одређивање садржаја укупних фенола (зависност очитане апсорбанце од концентрације галне киселине)



Табела 8.14. Упоредни приказ садржаја укупних фенола код ИТ и СРБ изолата етанолних екстраката гљиве *S. commune* Fr.

Екстракти		Садржај укупних фенола код ИТ соја (mg еквиваленције ГК/g с.м.)	Садржај укупних фенола код СРБ соја (mg еквиваленције ГК/g с.м.)
Филтрат	7 дана	69,48 ± 1,00	84,60 ± 1,64
	14 дана	75,23 ± 1,04	81,93 ± 0,81
	21 дан	77,52 ± 0,97	78,27 ± 1,75
	28 дана	68,70 ± 0,30	76,14 ± 1,42
Биомаса	7 дана	53,49 ± 1,97	40,22 ± 0,82
	14 дана	76,65 ± 1,30	82,62 ± 0,99
	21 дан	42,74 ± 1,40	63,28 ± 1,28
	28 дана	70,01 ± 0,65	2,09 ± 0,06

Табела 8.15. Детерминација садржаја укупних фенола код етанолних екстраката гљиве *S. commune* Fr.

Екстракт	Радна конц. ГК (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{Sr}	A _{Kor}	A _{Sr} - A _{Kor}	Очитана конц. ГК (µg/mL)	mg ек. ГК/g с.м.	Средња вредност ± СД (mg ек. ГК/g с.м.)
Филтрат 7 дана ИТА										
ЕТ	2000,00	2,033	2,081	1,948	2,021	0,050	1,971	83,477	70,67	69,48 ± 1,05
	1000,00	1,720	1,682	1,675	1,692	0,043	1,649	69,477	69,04	
	500,00	1,131	1,207	1,245	1,194	0,046	1,148	47,659	68,72	
Филтрат 14 дана ИТА										
ЕТ	2000,00	1,921	1,981	1,932	1,945	0,047	1,898	80,280	74,49	75,23 ± 1,04
	1000,00	1,812	1,886	1,846	1,848	0,047	1,800	76,050	77,70	
	500,00	1,570	1,653	1,615	1,613	0,047	1,566	65,851	75,96	
Филтрат 21 дан ИТА										
ЕТ	2000,00	1,790	1,962	1,979	1,910	0,052	1,858	78,563	77,29	77,52 ± 0,97
	1000,00	1,877	1,864	1,907	1,883	0,049	1,834	77,524	76,70	
	500,00	1,702	1,681	1,742	1,708	0,049	1,659	69,917	78,59	
Филтрат 28 дана ИТА										
ЕТ	2000,00	1,975	1,898	1,966	1,946	0,052	1,895	80,155	56,48	68,70 ± 0,36
	1000,00	1,402	1,677	1,688	1,589	0,051	1,538	64,625	68,44	
	500,00	1,488	1,575	1,567	1,543	0,047	1,496	62,805	68,95	

Биомаса 7 дана ИТА										
ЕТ	2000,00	1,956	2,224	2,245	2,142	0,048	2,094	88,827	69,96	53,49 ± 1,97
	1000,00	1,705	1,359	1,295	1,453	0,045	1,408	58,981	54,89	
	500,00	1,407	1,439	1,436	1,427	0,047	1,380	57,754	52,10	
Биомаса 14 дана ИТА										
ЕТ	2000,00	2,070	2,085	1,968	2,041	0,046	1,995	84,525	75,45	76,65 ± 1,37
	1000,00	1,832	1,894	1,852	1,859	0,045	1,814	76,646	78,14	
	500,00	1,605	1,720	1,689	1,671	0,045	1,626	68,471	76,35	
Биомаса 21 дан ИТА										
ЕТ	2000,00	1,534	1,656	1,615	1,602	0,053	1,548	65,085	41,75	42,74 ± 1,40
	1000,00	1,058	1,103	0,953	1,038	0,046	0,993	40,896	43,73	
	500,00	0,589	0,700	0,703	0,664	0,050	0,615	24,445	37,21	
Биомаса 28 дана ИТА										
ЕТ	2000,00	1,806	1,876	1,893	1,858	0,053	1,805	76,266	70,02	70,01 ± 0,65
	1000,00	1,704	1,719	1,689	1,704	0,042	1,662	70,010	70,65	
	500,00	1,311	1,357	1,400	1,356	0,046	1,310	54,715	69,36	
Филтрат 7 дана СРБ										
ЕТ	2000,00	2,117	2,215	2,366	2,233	0,053	2,180	92,548	65,19	61,81 ± 4,78
	1000,00	2,021	2,017	2,084	2,040	0,043	1,997	84,603	58,43	
	500,00	1,685	1,775	1,773	1,744	0,047	1,697	71,559	72,25	
Филтрат 14 дана СРБ										
ЕТ	2000,00	2,056	2,157	2,231	2,148	0,049	2,099	89,039	83,75	84,60 ± 1,64
	1000,00	1,978	2,004	1,968	1,983	0,048	1,936	81,931	83,57	
	500,00	1,780	1,816	1,759	1,785	0,047	1,738	73,319	86,49	
Филтрат 21 дан СРБ										
ЕТ	2000,00	2,094	2,169	2,134	2,132	0,050	2,082	88,298	76,26	78,27 ± 1,75
	1000,00	1,854	1,919	1,929	1,901	0,049	1,851	78,271	79,06	
	500,00	1,768	1,806	1,806	1,793	0,049	1,744	73,609	79,49	
Филтрат 28 дана СРБ										
ЕТ	2000,00	1,974	2,001	1,927	1,967	0,051	1,916	81,082	71,65	76,14 ± 1,42
	1000,00	1,750	1,830	1,876	1,819	0,051	1,768	74,643	75,14	
	500,00	1,644	1,743	1,738	1,708	0,046	1,662	70,039	77,15	
Биомаса 7 дана СРБ										
ЕТ	2000,00	1,509	1,531	1,520	1,520	0,048	1,473	61,789	40,02	40,22 ± 0,82
	1000,00	1,017	1,006	1,043	1,022	0,045	0,977	40,220	39,52	

	500,00	0,622	0,653	0,634	0,637	0,048	0,588	23,306	41,12	
Биомаса 14 дана СРБ										
ЕТ	2000,00	2,185	2,257	2,203	2,215	0,053	2,162	91,766	83,77	82,62 ± 0,99
	1000,00	2,027	1,986	1,989	2,001	0,050	1,951	82,620	81,98	
	500,00	1,651	1,758	1,780	1,730	0,046	1,683	70,960	82,12	
Биомаса 21 дан СРБ										
ЕТ	2000,00	1,956	1,951	1,926	1,944	0,061	1,884	79,666	62,37	163,28 ± 1,28
	1000,00	1,538	1,661	1,579	1,593	0,052	1,541	64,757	67,72	
	500,00	1,029	1,067	1,110	1,068	0,050	1,018	42,015	64,18	
Биомаса 28 дана СРБ										
ЕТ	2000,00	1,948	1,928	1,905	1,927	0,069	1,858	78,563	72,12	72,09 ± 0,06
	1000,00	1,761	1,685	1,759	1,735	0,051	1,684	70,996	68,82	
	500,00	1,301	1,287	1,341	1,310	0,051	1,259	52,494	72,05	

Табела 8.16. Детерминација садржаја укупних фенола код метанолних екстраката биљке *Pisum sativum* L. у оптималним условима и условима стреса – суше након биопрајминга са ездо- и интраполисахаридима

Екстракт	Радна конц. АК (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A _{sr} - A _{kor}	Очитана конц. АК (µg/mL)	mg ек. АК/g с.м.	Средња вредност ± СД (mg ек. АК/g с.м.)
Контрола, оптимални услови										
НД	2000,00	0,918	0,726	0,675	0,773	0,083	0,690	23,91	23,91	20,69 ± 2,82
	1000,00	0,689	0,567	0,588	0,615	0,086	0,528	18,62	18,62	
	500,00	0,429	0,381	0,418	0,409	0,069	0,341	19,55	19,55	
К	2000,00	0,726	0,686	0,680	0,697	0,068	0,630	9,41	18,81	21,47 ± 3,75
	1000,00	0,433	0,381	0,413	0,409	0,056	0,353	4,84	9,67	
	500,00	0,323	0,218	0,383	0,308	0,053	0,255	12,06	24,12	
Хидропрајминг, оптимални услови										
НД	2000,00	0,988	1,018	1,034	1,013	0,060	0,889	33,72	16,86	18,20 ± 1,18
	1000,00	0,661	0,699	0,693	0,684	0,055	0,541	38,14	19,07	
	500,00	0,400	0,498	0,589	0,496	0,048	0,323	37,36	18,68	
К	2000,00	0,674	0,615	0,598	0,629	0,050	0,579	24,84	49,69	45,79 ± 3,45
	1000,00	0,405	0,509	0,426	0,447	0,054	0,393	22,29	44,58	
	500,00	0,280	0,324	0,284	0,296	0,050	0,246	21,56	43,11	

ЕПСХ ИТА, оптимални услови										
НД	2000,00	0,908	1,010	0,992	0,970	0,081	0,889	33,72	16,86	18,20 ± 1,18
	1000,00	0,643	0,653	0,567	0,621	0,080	0,541	38,14	19,07	
	500,00	0,380	0,412	0,365	0,386	0,063	0,323	37,36	18,68	
К	2000,00	0,560	0,594	0,614	0,589	0,062	0,527	19,37	19,37	20,65 ± 1,20
	1000,00	0,409	0,497	0,464	0,456	0,047	0,409	20,85	20,85	
	500,00	0,268	0,391	0,449	0,369	0,052	0,318	21,74	21,74	
ИПСХ ИТА, оптимални услови										
НД	2000,00	0,916	0,966	0,861	0,914	0,074	0,840	34,34	17,17	17,13 ± 1,13
	1000,00	0,590	0,556	0,513	0,553	0,054	0,499	36,48	18,24	
	500,00	0,333	0,376	0,336	0,348	0,054	0,294	31,95	15,98	
К	2000,00	0,535	0,567	0,527	0,543	0,064	0,479	11,61	11,61	12,05 ± 1,55
	1000,00	0,369	0,419	0,350	0,379	0,049	0,330	13,77	13,77	
	500,00	0,307	0,265	0,327	0,300	0,054	0,246	10,76	10,76	
ЕПСХ СРБ, оптимални услови										
НД	2000,00	0,912	0,954	0,946	0,937	0,056	0,881	8,82	17,64	18,60 ± 0,84
	1000,00	0,547	0,535	0,528	0,537	0,053	0,484	9,59	19,18	
	500,00	0,308	0,326	0,323	0,319	0,052	0,267	9,49	18,99	
К	2000,00	0,564	0,604	0,612	0,593	0,059	0,534	11,00	11,00	10,82 ± 0,26
	1000,00	0,362	0,365	0,353	0,360	0,056	0,304	11,16	11,16	
	500,00	0,250	0,243	0,247	0,247	0,050	0,197	10,63	10,63	
ИПСХ СРБ, оптимални услови										
НД	2000,00	0,906	0,990	0,970	0,955	0,059	0,896	11,22	22,43	24,17 ± 0,02
	1000,00	0,601	0,639	0,652	0,630	0,054	0,577	12,10	24,19	
	500,00	0,362	0,383	0,382	0,376	0,052	0,324	12,08	24,16	
К	2000,00	1,148	1,213	1,222	1,194	0,055	1,139	13,35	26,69	30,41 ± 0,35
	1000,00	0,758	0,829	0,822	0,803	0,044	0,759	15,08	30,16	
	500,00	0,414	0,454	0,460	0,443	0,055	0,388	15,33	30,66	
Контрола, суша										
НД	2000,00	0,792	0,887	0,841	0,840	0,086	0,754	18,72	18,72	18,82 ± 0,68
	1000,00	0,542	0,561	0,53	0,544	0,059	0,485	19,55	19,55	
	500,00	0,297	0,348	0,324	0,323	0,05	0,273	18,20	18,20	
К	2000,00	0,654	0,66	0,661	0,658	0,053	0,605	11,89	11,89	12,70 ± 0,71
	1000,00	0,375	0,405	0,401	0,394	0,049	0,345	13,19	13,19	
	500,00	0,243	0,313	0,265	0,274	0,05	0,224	13,02	13,02	
Хидропрајминг, суша										

НД	2000,00	0,81	0,805	0,829	0,815	0,066	0,482	11,76	11,76	11,36 ± 0,76
	1000,00	0,501	0,485	0,524	0,503	0,05	0,314	11,84	11,84	
	500,00	0,309	0,324	0,288	0,307	0,062	0,195	10,49	10,49	
К	2000,00	0,546	0,551	0,526	0,541	0,059	0,482	11,76	11,76	11,36 ± 0,76
	1000,00	0,373	0,375	0,344	0,364	0,05	0,314	11,84	11,84	
	500,00	0,233	0,251	0,249	0,244	0,049	0,195	10,49	10,49	
ЕПСХ ИТА, суша										
НД	2000,00	0,784	0,818	0,79	0,797	0,739	0,543	29,29	14,65	14,94 ± 0,39
	1000,00	0,486	0,505	0,531	0,507	0,456	0,330	30,77	15,39	
	500,00	0,293	0,334	0,32	0,316	0,266	0,219	29,56	14,78	
К	2000,00	0,518	0,494	0,49	0,501	0,055	0,446	17,85	8,92	8,55 ± 0,33
	1000,00	0,347	0,323	0,344	0,338	0,051	0,287	16,80	8,40	
	500,00	0,207	0,248	0,243	0,233	0,048	0,185	16,63	8,32	
ИПСХ ИТА, суша										
НД	2000,00	0,87	0,775	0,899	0,848	0,057	0,791	16,94	21,86	16,06 ± 1,41
	1000,00	0,498	0,543	0,543	0,528	0,052	0,476	18,04	23,27	
	500,00	0,445	0,4613	0,3837	0,430	0,0526	0,377	18,65	24,06	
К	2000,00	0,547	0,525	0,524	0,532	0,05	0,482	9,97	9,97	10,13 ± 0,18
	1000,00	0,333	0,341	0,336	0,337	0,051	0,286	10,32	10,32	
	500,00	0,222	0,223	0,202	0,216	0,049	0,167	10,10	10,10	
ЕПСХ СРБ, суша										
НД	2000,00	1,191	1,193	1,152	1,179	0,067	1,111	46,61	23,30	23,03 ± 0,51
	1000,00	0,763	0,772	0,814	0,783	0,054	0,729	46,70	23,35	
	500,00	0,440	0,452	0,485	0,459	0,053	0,406	44,89	22,45	
К	2000,00	0,676	0,698	0,705	0,693	0,059	0,635	7,50	15,00	15,99 ± 0,8
	1000,00	0,431	0,474	0,450	0,452	0,053	0,398	8,21	16,42	
	500,00	0,276	0,293	0,294	0,288	0,051	0,237	8,27	16,54	
ИПСХ СРБ, суша										
НД	2000,00	1,154	1,061	1,118	1,111	0,062	1,049	13,86	27,72	28,56 ± 1,22
	1000,00	0,695	0,702	0,738	0,712	0,053	0,659	14,00	28,00	
	500,00	0,417	0,420	0,443	0,427	0,046	0,381	14,98	29,95	
К	2000,00	0,907	0,934	0,978	0,940	0,065	0,875	11,66	23,31	23,28 ± 0,50
	1000,00	0,586	0,601	0,627	0,605	0,051	0,554	11,38	22,76	
	500,00	0,370	0,363	0,375	0,369	0,049	0,320	11,88	23,76	

НД – наземни део; К – корен.

8.2.6. Детерминација капацитета „хватања“ DPPH радикала

Табела 8.17. Неутрализација DPPH радикала полисахаридним и етанолним екстрактима врсте *S. commune* Fr.

Радна конц. ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{кор}	RSC ₁ (%)	RSC ₂ (%)	RSC ₃ (%)	Средња вредност (%)
Филтрат 7 дана ИТА ПСХ								
400	0,455	0,328	0,727	0,159	-47,164	15,821	-182,388	-71,244
200	0,267	0,321	0,469	0,168	50,796	24,080	-49,403	8,491
100	0,221	0,199	0,222	0,052	16,169	27,065	15,423	19,552
50	0,203	0,214	0,190	0,046	21,741	16,070	28,159	21,990
25	0,208	0,208	0,203	0,042	17,861	17,562	20,000	18,474
A _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199				0,201
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)								16,03 ± 4,30
Филтрат 14 дана ИТА ПСХ								
400	0,186	0,198	0,198	0,048	31,443	25,622	25,522	27,529
200	0,194	0,214	0,198	0,050	28,557	18,308	26,269	24,378
100	0,216	0,211	0,211	0,045	15,025	17,463	17,313	16,600
50	0,203	0,210	0,210	0,042	19,751	16,418	16,318	17,496
25	0,157	0,213	0,210	0,040	42,040	13,781	15,672	23,831
A _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199				0,201
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)								107,94 ± 2,36
Филтрат 21 дан ИТА ПСХ								
400	0,209	0,240	0,275	0,081	36,219	20,896	3,731	20,282
200	0,205	0,219	0,199	0,060	27,960	21,244	30,995	26,733
100	0,197	0,209	0,193	0,071	37,363	31,095	39,154	35,871
50	0,221	0,199	0,215	0,050	14,975	26,169	18,010	19,718
25	0,205	0,198	0,196	0,044	19,701	23,582	24,179	22,488
A _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199				0,201
IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)								74,76 ± 19,70
Филтрат 28 дана ИТА ПСХ								
400	0,205	0,224	0,239	0,053	24,378	14,677	7,214	15,423
200	0,202	0,213	0,204	0,044	21,294	15,970	20,448	19,237
100	0,207	0,207	0,203	0,045	19,204	19,154	21,194	19,851
50	0,203	0,205	0,202	0,047	22,289	21,493	23,035	22,272
25	0,213	0,219	0,200	0,044	15,821	12,935	22,090	16,949
A _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199				0,201

IC₅₀					189,81 ± 7,96				
(µg/mL)									
Биомаса 7 дана ИТА ПСХ									
400	0,196	0,185	0,193	0,066	35,473	41,194	37,214	37,960	
200	0,201	0,254	0,192	0,065	32,438	5,771	36,866	25,025	
100	0,212	0,204	0,202	0,041	15,174	18,905	20,000	18,027	
50	0,207	0,202	0,201	0,050	21,542	24,080	24,726	23,449	
25	0,209	0,205	0,208	0,043	17,562	19,652	18,109	18,441	
A _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199					0,201
IC₅₀					94,89 ± 8,41				
(µg/mL)									
Биомаса 14 дана ИТА ПСХ									
400	0,205	0,208	0,210	0,042	18,607	17,562	16,169	17,446	
200	0,206	0,219	0,220	0,048	21,542	15,124	14,776	17,148	
100	0,204	0,206	0,213	0,042	19,552	18,408	14,826	17,595	
50	0,209	0,209	0,212	0,042	17,114	17,065	15,672	16,617	
25	0,210	0,210	0,174	0,042	16,567	16,567	34,378	22,504	
A _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199					0,201
IC₅₀					14,45 ± 6,83				
(µg/mL)									
Биомаса 21 дан ИТА ПСХ									
400	0,234	0,298	0,242	0,105	36,020	4,080	31,791	23,964	
200	0,209	0,207	0,214	0,072	31,990	32,786	29,403	31,393	
100	0,196	0,196	0,192	0,054	29,453	29,453	31,095	30,000	
50	0,216	0,217	0,215	0,042	13,383	12,786	13,781	13,317	
25	0,211	0,216	0,216	0,043	16,368	14,080	14,129	14,859	
A _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199					0,201
IC₅₀					85,39 ± 1,61				
(µg/mL)									
Биомаса 28 дана ИТА ПСХ									
400,00	0,179	0,167	0,178	0,051	36,269	42,040	36,716	38,342	
200,00	0,233	0,406	0,188	0,101	33,881	-51,940	56,716	12,886	
100,00	0,197	0,200	0,212	0,044	23,582	22,189	16,318	20,697	
50,00	0,202	0,195	0,199	0,050	24,527	27,910	25,920	26,119	
25,00	0,245	0,194	0,184	0,057	6,368	31,493	36,517	24,793	
A _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199					0,201
IC₅₀					93,48 ± 0,01				
(µg/mL)									
Филтрат 7 дана СРБ ПСХ									
400	0,187	0,193	0,197	0,060	37,376	34,554	32,228	34,719	
200	0,198	0,193	0,204	0,053	28,168	30,693	25,446	28,102	

Јована Мишковић
Докторска дисертација

100	0,198	0,205	0,205	0,054	28,762	25,347	25,347	26,485
50	0,208	0,195	0,197	0,044	19,158	25,347	24,257	22,921
25	0,200	0,200	0,201	0,045	23,020	22,921	22,327	22,756
A _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199				0,201
IC ₅₀ (µg/mL)								15,76 ± 0,63
Филтрат 14 дана СРБ ПСХ								
400	0,222	0,291	0,189	0,047	13,416	-21,040	29,505	7,294
200	0,172	0,191	0,193	0,048	38,762	29,158	28,416	32,112
100	0,205	0,202	0,199	0,044	20,446	21,782	23,267	21,832
50	0,198	0,198	0,198	0,045	23,911	24,059	24,158	24,043
25	0,202	0,201	0,197	0,044	21,683	22,079	24,010	22,591
A _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199				0,201
IC ₅₀ (µg/mL)								32,42 ± 3,09
Филтрат 21 дан СРБ ПСХ								
400	0,184	0,225	0,187	0,090	53,465	33,168	51,980	46,205
200	0,181	0,230	0,197	0,078	48,812	24,703	41,238	38,251
100	0,191	0,186	0,192	0,055	32,871	35,198	32,129	33,399
50	0,196	0,194	0,191	0,049	27,327	27,921	29,653	28,300
25	0,197	0,197	0,196	0,045	24,604	24,604	25,396	24,868
A _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199				0,201
IC ₅₀ (µg/mL)								30,18 ± 2,25
Филтрат 28 дана СРБ ПСХ								
400	0,281	0,255	0,233	0,085	3,168	16,238	26,931	15,446
200	0,278	0,313	0,279	0,064	-6,040	-23,465	-6,238	-11,914
100	0,200	0,202	0,201	0,043	22,376	21,386	21,931	21,898
50	0,197	0,200	0,204	0,045	24,356	23,069	21,089	22,838
25	0,201	0,202	0,200	0,043	21,485	21,089	22,178	21,584
A _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199				0,201
IC ₅₀ (µg/mL)								69,69 ± 3,93
Биомаса 7 дана СРБ ПСХ								
400	0,201	0,194	0,183	0,119	59,406	63,267	68,614	63,762
200	0,195	0,195	0,194	0,077	41,238	41,584	41,881	41,568
100	0,196	0,203	0,200	0,049	27,178	23,614	25,396	25,396
50	0,197	0,219	0,200	0,052	28,515	17,475	27,030	24,340
25	0,196	0,202	0,204	0,044	24,703	21,733	20,743	22,393
A _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199				0,201
IC ₅₀ (µg/mL)								18,9 2± 6,12

Биомаса 14 дана СРБ ПСХ									
400	0,235	0,192	0,224	0,056	11,386	32,871	17,277	20,512	
200	0,213	0,230	0,212	0,043	15,545	7,277	15,990	12,937	
100	0,194	0,201	0,193	0,043	25,000	21,733	25,891	24,208	
50	0,201	0,200	0,203	0,044	22,277	22,822	21,436	22,178	
25	0,201	0,205	0,203	0,053	26,485	24,802	25,792	25,693	
А _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199				0,201	
IC ₅₀ (µg/mL)									71,55 ± 3,43
Биомаса 21 дан СРБ ПСХ									
400	0,196	0,200	0,201	0,049	27,376	25,297	24,901	25,858	
200	0,220	0,199	0,205	0,063	22,426	32,921	29,802	28,383	
100	0,202	0,210	0,202	0,047	23,366	19,554	23,218	22,046	
50	0,215	0,202	0,201	0,041	13,911	20,099	20,941	18,317	
25	0,204	0,206	0,198	0,045	21,040	20,198	24,059	21,766	
А _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199				0,201	
IC ₅₀ (µg/mL)									69,13 ± 4,24
Биомаса 28 дана СРБ ПСХ									
400	0,203	0,211	0,269	0,073	35,594	31,782	3,069	23,482	
200	0,223	0,263	0,244	0,196	86,485	67,030	76,188	76,568	
100	0,206	0,196	0,209	0,045	20,248	25,099	19,059	21,469	
50	0,220	0,200	0,205	0,051	16,337	26,386	23,812	22,178	
25	0,193	0,202	0,218	0,043	25,644	21,287	13,168	20,033	
А _{kontrola}	0,203	0,204	0,199	0,199				0,201	
IC ₅₀ (µg/mL)									51,41 ± 11,27
Филтрат 7 дана ИТА ЕТ									
100	0,124	0,112	0,161	0,045	59,281	65,440	40,621	55,11	
50	0,166	0,176	0,158	0,044	37,381	32,000	41,232	36,87	
25	0,178	0,180	0,181	0,042	30,460	29,441	28,973	29,62	
12,5	0,189	0,182	0,168	0,042	24,562	27,851	35,445	29,28	
1,25	0,193	0,196	0,194	0,042	22,511	21,132	21,740	21,79	
А _{kontrola}	0,183	0,201	0,195	0,201				0,195	
IC ₅₀ (µg/mL)					79,12	66,18	X		72,65 ± 9,15
Филтрат 14 дана ИТА ЕТ									
100	0,074	0,112	0,103	0,044	84,820	64,921	69,591	73,11	
50	0,153	0,157	0,154	0,041	42,721	40,975	42,052	41,91	
25	0,172	0,175	0,172	0,043	33,691	32,101	33,542	33,11	
12,5	0,186	0,187	0,182	0,040	25,132	24,623	26,924	25,56	
1,25	0,155	0,207	0,198	0,041	41,541	15,081	19,692	25,44	

Јована Мишковић
Докторска дисертација

A_{kontrola}	0,183	0,201	0,195	0,201					0,195
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					57,51	65,54	61,80		63,67 \pm 2,65
Филтрат 21 дан ИТА ЕТ									
100	0,083	0,095	0,093	0,045	80,51	74,31	75,33		76,72
50	0,152	0,152	0,120	0,045	45,18	45,44	61,54		50,72
25	0,172	0,181	0,173	0,041	32,56	28,05	31,95		30,85
12,5	0,183	0,184	0,182	0,042	27,28	27,13	27,79		27,40
1,25	0,184	0,213	0,197	0,040	25,95	11,13	19,49		18,85
A_{kontrola}	0,183	0,201	0,195	0,201					0,195
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					57,52	53,85	54,92		55,43 \pm 1,89
Филтрат 28 дана ИТА ЕТ									
100	0,130	0,109	0,109	0,043	55,18	66,00	66,00		62,39
50	0,158	0,163	0,155	0,041	39,74	37,33	41,64		39,57
25	0,176	0,180	0,177	0,042	31,49	29,49	30,97		30,65
12,5	0,188	0,186	0,186	0,042	25,23	26,15	26,26		25,88
1,25	0,198	0,198	0,198	0,041	19,44	19,74	19,59		19,59
A_{kontrola}	0,183	0,201	0,195	0,201					0,195
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	90%				82,04	64,77	66,33		65,55 \pm 1,10
Биомаса 7 дана ИТА ЕТ									
100	0,126	0,115	0,131	0,041	56,36	62,36	53,90		57,54
50	0,149	0,140	0,160	0,042	45,33	49,64	39,38		44,79
25	0,175	0,172	0,172	0,040	30,46	32,26	32,10		31,61
12,5	0,178	0,164	0,196	0,042	29,90	37,18	20,82		29,30
1,25	0,195	0,194	0,195	0,042	21,54	21,64	21,38		21,52
A_{kontrola}	0,183	0,201	0,195	0,201					0,195
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					70,30	84,06	81,33		82,96 \pm 1,93
Биомаса 14 дана ИТА ЕТ									
100	0,084	0,116	0,086	0,043	79,03	62,87	78,15		73,35
50	0,142	0,113	0,141	0,044	49,44	64,31	50,15		54,63
25	0,164	0,172	0,174	0,044	38,36	34,51	33,23		35,37
12,5	0,184	0,177	0,187	0,042	26,97	30,46	25,38		27,61
1,25	0,195	0,199	0,198	0,042	21,49	19,74	19,95		20,39
A_{kontrola}	0,183	0,201	0,195	0,201					0,195
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					48,88	57,01	49,80		49,34 \pm 0,65
Биомаса 21 дан ИТА ЕТ									
250	0,087	0,097	0,107	0,051	81,95	76,77	71,28		76,67

Јована Мишковић
Докторска дисертација

100	0,192	0,189	0,187	0,042	23,03	24,21	25,28	24,17
50	0,174	0,174	0,179	0,042	32,15	32,36	29,95	31,49
25	0,186	0,189	0,166	0,039	24,92	23,23	34,97	27,71
12,5	0,189	0,192	0,191	0,041	24,51	22,82	23,13	23,49
1,25	0,197	0,201	0,199	0,041	19,90	17,90	18,92	18,91
A _{kontrola}	0,183	0,201	0,195	0,201				0,195
IC ₅₀ (µg/mL)					122,96	118,30	139,63	120,63 ± 3,29
Биомаса 28 дана ИТА ЕТ								
250	0,074	0,072	0,074	0,045	84,97	86,15	84,82	85,32
100	0,153	0,157	0,142	0,041	48,95	47,12	48,46	48,18
50	0,170	0,179	0,177	0,041	41,05	37,08	37,90	38,68
25	0,189	0,190	0,186	0,040	32,10	31,78	33,42	32,44
12,5	0,195	0,195	0,190	0,040	29,63	29,59	31,78	30,33
1,25	0,174	0,211	0,196	0,041	39,41	22,28	29,27	30,32
A _{kontrola}	0,183	0,201	0,195	0,201				0,195
IC ₅₀ (µg/mL)					98,46	104,22	106,57	105,39 ± 1,66
Филтрат 7 дана СРБ ЕТ								
100	0,122	0,118	0,121	0,042	61,12	62,73	61,56	61,80
50	0,168	0,161	0,166	0,042	38,93	42,10	39,51	40,18
25	0,181	0,178	0,178	0,041	31,56	32,88	32,88	32,44
12,5	0,188	0,193	0,194	0,042	28,88	26,39	25,80	27,02
1,25	0,206	0,204	0,205	0,042	19,85	20,98	20,24	20,36
A _{kontrola}	0,183	0,201	0,195	0,201				0,195
IC ₅₀ (µg/mL)					72,83	68,03	71,73	70,86 ± 2,52
Филтрат 14 дана СРБ ЕТ								
100	0,114	0,116	0,114	0,046	66,49	65,66	66,63	66,26
50	0,159	0,147	0,150	0,043	42,98	49,07	47,56	46,54
25	0,178	0,174	0,174	0,042	33,41	35,32	35,37	34,70
12,5	0,194	0,190	0,190	0,041	25,51	27,56	27,46	26,85
1,25	0,203	0,202	0,207	0,043	22,10	22,34	19,90	21,45
A _{kontrola}	0,183	0,201	0,195	0,201				0,195
IC ₅₀ (µg/mL)					64,36	51,97	55,25	53,61 ± 2,32
Филтрат 21 дан СРБ ЕТ								
100	0,105	0,104	0,106	0,043	69,90	70,10	69,37	69,79
50	0,147	0,152	0,152	0,041	48,59	45,76	45,90	46,75
25	0,179	0,177	0,175	0,041	32,73	33,71	34,78	33,74
12,5	0,190	0,191	0,197	0,042	28,05	27,51	24,54	26,70
1,25	0,207	0,208	0,202	0,039	18,15	17,56	20,44	18,72

Јована Мишковић
Докторска дисертација

$A_{kontrola}$	0,183	0,201	0,195	0,201					0,195
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					54,46	56,70	56,74		55,96 ± 1,03
Филтрат 28 дана СРБ ЕТ									
100	0,119	0,126	0,114	0,043	62,83	59,56	65,46		62,62
50	0,159	0,157	0,164	0,041	42,24	43,37	40,15		41,92
25	0,182	0,182	0,181	0,043	32,24	32,05	32,49		32,26
12,5	0,192	0,197	0,190	0,041	25,90	23,61	27,12		25,54
1,25	0,205	0,209	0,207	0,044	21,51	19,32	20,49		20,44
$A_{kontrola}$	0,183	0,201	0,195	0,201					0,195
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					68,20	66,17	67,55		67,31 ± 1,03
Биомаса 7 дана СРБ ЕТ									
500	0,142	0,146	0,139	0,059	59,32	57,37	60,98		59,22
250	0,198	0,189	0,181	0,063	34,54	38,54	42,83		38,63
100	0,191	0,194	0,190	0,042	27,56	25,80	27,80		27,06
50	0,200	0,204	0,199	0,041	22,34	20,39	22,83		21,85
25	0,200	0,201	0,200	0,040	22,24	21,32	22,20		21,92
12,5	0,203	0,204	0,203	0,043	21,85	21,46	21,71		21,67
1,25	0,205	0,204	0,205	0,042	20,63	21,22	20,78		20,88
$A_{kontrola}$	0,183	0,201	0,195	0,201					0,195
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					410,30	389,30	333,53		399,80 ± 14,85
Биомаса 14 дана СРБ ЕТ									
100	0,125	0,127	0,123	0,044	60,44	59,32	61,56		60,44
50	0,166	0,164	0,171	0,043	39,85	40,88	37,37		39,37
25	0,181	0,187	0,190	0,042	32,10	29,07	27,46		29,54
12,5	0,196	0,196	0,196	0,042	25,02	25,17	25,27		25,15
1,25	0,205	0,206	0,207	0,042	20,39	19,66	19,46		19,84
$A_{kontrola}$	0,183	0,201	0,195	0,201					0,195
IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					73,39	73,92	76,64		74,65 ± 1,74
Биомаса 21 дан СРБ ЕТ									
500	0,060	0,074	0,074	0,046	93,07	86,68	86,44		88,73
250	0,123	0,127	0,127	0,046	62,49	60,39	60,19		61,02
100	0,164	0,159	0,161	0,041	39,85	42,15	41,17		41,06
50	0,184	0,182	0,185	0,042	31,12	31,90	30,44		31,15
25	0,203	0,194	0,195	0,041	21,32	25,66	25,02		24,00
12,5	0,201	0,200	0,203	0,041	21,85	22,44	21,17		21,82
1,25	0,208	0,209	0,206	0,046	21,22	20,63	22,39		21,41
$A_{kontrola}$	0,183	0,201	0,195	0,201					0,195

IC ₅₀ (µg/mL)					163,96	161,93	166,95	164,28 ± 2,52
Биомаса 28 дана СРБ ЕТ								
250	0,084	0,086	0,123	0,062	82,47	88,05	70,10	
100	0,172	0,182	0,177	0,043	34,59	32,15	34,78	
50	0,194	0,190	0,190	0,042	27,14	27,76	27,95	
25	0,207	0,197	0,204	0,042	21,41	24,24	20,63	
12,5	0,202	0,200	0,205	0,040	20,73	21,66	19,41	
1,25	0,205	0,206	0,213	0,041	18,34	19,41	16,00	
A _{kontrola}	0,183	0,201	0,195	0,201				0,195
IC ₅₀ (µg/mL)					141,65	133,35	162,51	137,50 ± 5,87

Табела 8.18. Неутрализација DPPH радикала метанолним екстрактима грашка *Pisum sativum* L. у оптималним условима и условима стреса – суше након биопрајминга езго- и интраполисахаридима

Радна конц. (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁ (%)	RSC ₂ (%)	RSC ₃ (%)	Средња вредност (%)
Контрола корен, оптимални услови								
800	0,108	0,116	0,131	0,050	73,62	69,68	63,03	68,78
400	0,142	0,146	0,146	0,048	57,11	55,23	55,14	55,83
200	0,170	0,180	0,180	0,051	45,14	40,55	40,78	42,16
100	0,188	0,191	0,194	0,057	40,14	38,39	37,16	38,56
50	0,190	0,196	0,210	0,052	36,42	33,72	27,20	32,45
A _{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218
IC ₅₀ (µg/mL)					273,95	323,62	315,96	319,79 ± 5,42
Корен надземни део, оптимални услови								
800	0,065	0,067	0,066	0,064	99,59	98,35	98,90	98,94
400	0,096	0,091	0,101	0,061	83,81	86,10	81,56	83,82
200	0,147	0,142	0,150	0,050	55,18	57,75	53,85	55,60
100	0,178	0,181	0,173	0,047	39,82	38,49	42,02	40,11
50	0,183	0,187	0,185	0,047	37,57	35,64	36,38	36,53
A _{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218
IC ₅₀ (µg/mL)					171,54	164,28	171,02	168,95 ± 4,05
Хидропрајминг корен, оптимални услови								

Јована Мишковић
Докторска дисертација

800	0,196	0,185	0,193	0,066	40,50	45,78	42,11	42,80
400	0,201	0,254	0,192	0,065	37,71	13,12	41,79	30,87
200	0,212	0,204	0,202	0,041	21,79	25,23	26,24	24,42
100	0,207	0,202	0,201	0,050	27,66	30,00	30,60	29,42
50	0,209	0,205	0,208	0,043	40,50	45,78	42,11	42,80
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218
IC₂₅(µg/mL)					95,33	/	53,31	74,32 ± 29,71
Хидропрајминг надземни део, оптимални услови								
800	0,127	0,131	0,123	0,055	67,20	65,37	68,99	67,19
400	0,155	0,161	0,162	0,055	54,27	51,51	50,73	52,17
200	0,182	0,185	0,181	0,058	43,03	41,74	43,39	42,72
100	0,189	0,185	0,186	0,054	38,39	40,00	39,54	39,31
50	0,191	0,191	0,196	0,066	42,84	43,03	40,50	42,13
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218
IC₅₀ (µg/mL)					336,64	384,08	381,76	382,92 ± 1,64
ЕПСХ ИТА корен, оптимални услови								
800	0,132	0,134	0,139	0,054	64,50	63,17	61,28	62,98
400	0,166	0,165	0,164	0,053	48,26	48,72	49,45	48,81
200	0,184	0,190	0,181	0,056	41,19	38,67	42,66	40,84
100	0,194	0,188	0,195	0,064	40,50	43,39	40,00	41,30
50	0,195	0,228	0,195	0,054	35,28	20,00	35,50	30,26
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218
IC₅₀ (µg/mL)					434,20	332,03	406,00	390,74 ± 52,76
ЕПСХ ИТА надземни део, оптимални услови								
800	0,071	0,069	0,073	0,071	100,00	100,64	99,13	99,92
400	0,111	0,113	0,112	0,052	73,17	72,20	72,52	72,63
200	0,159	0,159	0,161	0,045	48,12	47,75	46,97	47,61
100	0,179	0,181	0,181	0,047	39,17	38,39	38,30	38,62
50	0,192	0,192	0,194	0,045	32,57	32,80	31,83	32,40
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218
IC₅₀ (µg/mL)					206,72	212,74	215,58	211,68 ± 4,52
ИПСХ ИТА корен, оптимални услови								
800	0,132	0,130	0,137	0,046	60,55	61,51	58,30	60,12
400	0,178	0,174	0,165	0,046	39,17	41,06	45,09	41,77

Јована Мишковић
Докторска дисертација

200	0,184	0,179	0,183	0,052	39,27	41,42	39,63	40,11
100	0,184	0,186	0,189	0,048	37,71	36,83	35,32	36,62
50	0,185	0,189	0,192	0,045	35,64	34,04	32,80	34,16
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218
IC₅₀					497,48	434,57	532,65	466,03 ±
(µg/mL)								44,68
ИПСХ ИТА надземни део, оптимални услови								
800	0,072	0,074	0,082	0,062	95,46	94,50	90,87	93,61
400	0,133	0,131	0,129	0,050	62,06	63,17	63,72	62,98
200	0,175	0,160	0,161	0,056	45,37	51,97	51,79	49,71
100	0,224	0,183	0,184	0,052	20,96	40,18	39,68	33,61
50	0,186	0,176	0,183	0,069	46,15	50,60	47,52	48,09
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218
IC₅₀					304,74	273,90	267,35	270,63 ±
(µg/mL)								4,63
ЕПСХ СРБ корен, оптимални услови								
800	0,106	0,119	0,107	0,053	73,21	66,28	72,40	70,63
400	0,142	0,144	0,143	0,050	53,11	52,24	52,76	52,70
200	0,151	0,167	0,154	0,050	48,57	40,56	47,19	45,44
100	0,166	0,166	0,163	0,051	41,38	41,63	42,76	41,92
50	0,163	0,166	0,165	0,050	42,40	40,61	41,38	41,46
A_{kontrola}	0,168	0,206	0,208	0,204				0,196
IC₅₀					298,45	394,78	311,56	305,01 ±
(µg/mL)								9,27
ЕПСХ СРБ надземни део, оптимални услови								
800	0,078	0,079	0,078	0,073	97,14	96,94	97,35	97,14
400	0,109	0,103	0,108	0,058	73,98	76,84	74,39	75,07
200	0,147	0,151	0,121	0,053	51,99	49,95	65,26	55,73
100	0,156	0,162	0,158	0,050	45,97	43,27	44,95	44,73
50	0,173	0,172	0,170	0,051	37,70	38,52	39,49	38,57
A_{kontrola}	0,168	0,206	0,208	0,204				0,196
IC₅₀					163,59	164,31	126,87	163,95 ±
(µg/mL)								0,51
ИПСХ СРБ корен, оптимални услови								
800	0,067	0,072	0,068	0,063	97,91	95,20	97,55	96,89
400	0,081	0,078	0,076	0,056	87,45	88,72	89,64	88,61
200	0,120	0,128	0,129	0,049	64,03	59,95	59,64	61,21
100	0,158	0,148	0,158	0,044	42,14	47,35	41,84	43,78

Јована Мишковић
Докторска дисертација

50	0,158	0,157	0,159	0,049	44,34	45,10	43,72	44,39
A_{kontrola}	0,168	0,206	0,208	0,204				0,196
IC₅₀ (µg/mL)					134,65	89,18	154,77	144,71 ± 14,23
ИПСХ СРБ надземни део, оптимални услови								
800	0,067	0,066	0,068	0,061	97,19	97,30	96,68	97,06
400	0,099	0,070	0,090	0,054	76,84	91,58	81,53	83,32
200	0,129	0,129	0,122	0,052	60,77	60,92	64,39	62,02
100	0,150	0,155	0,151	0,048	47,96	45,56	47,60	47,04
50	0,164	0,163	0,163	0,049	41,48	41,84	41,94	41,75
A_{kontrola}	0,168	0,206	0,208	0,204				0,196
IC₅₀ (µg/mL)					111,56	146,60	108,30	109,93 ± 2,30
Контрола корен, суша								
800	0,105	0,101	0,103	0,056	77,20	79,17	78,39	78,26
400	0,132	0,131	0,129	0,107	88,53	88,85	89,77	89,05
200	0,162	0,162	0,169	0,061	53,53	53,62	50,28	52,48
100	0,180	0,175	0,174	0,046	38,58	40,69	41,19	40,15
50	0,200	0,185	0,185	0,048	30,32	37,02	37,39	34,91
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218
IC₅₀ (µg/mL)					186,79	197,25	199,77	198,51 ± 1,78
Контрола надземни део, суша								
800	0,079	0,075	0,079	0,078	99,22	101,19	99,63	100,02
400	0,108	0,105	0,097	0,054	75,46	76,83	80,28	77,52
200	0,158	0,149	0,152	0,058	54,08	58,30	56,93	56,44
100	0,315	0,182	0,175	0,050	-21,65	39,54	42,43	20,11
50	0,180	0,189	0,186	0,055	42,89	38,72	40,14	40,58
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218
IC₅₀ (µg/mL)					198,44	155,85	154,70	155,98 ± 0,81
Хидропрајминг корен, суша								
800	0,123	0,125	0,125	0,051	67,02	66,42	66,33	66,59
400	0,175	0,158	0,152	0,051	43,12	50,96	54,08	49,39
200	0,175	0,172	0,174	0,048	41,79	43,21	42,20	42,40
100	0,215	0,191	0,186	0,049	23,81	34,82	37,20	31,94
50	0,220	0,198	0,190	0,049	21,33	31,70	35,41	29,48
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218

IC₅₀ (µg/mL)					441,70	361,53	325,64	376,29 ± 25,358
Хидропрајминг надземни део, суша								
800	0,081	0,076	0,079	0,065	92,94	95,23	93,49	93,88
400	0,111	0,113	0,124	0,053	73,12	72,20	67,11	70,81
200	0,148	0,144	0,144	0,052	56,19	57,80	57,89	57,29
100	0,175	0,177	0,180	0,070	52,16	51,33	49,95	51,15
50	0,189	0,197	0,188	0,073	46,74	43,12	47,48	45,78
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218
IC₅₀ (µg/mL)					95,16	104,09	91,50	93,33 ± 2,59
ЕПСХ ИТА корен, суша								
800	0,101	0,104	0,111	0,057	79,91	78,21	75,14	77,75
400	0,141	0,133	0,146	0,071	67,66	71,33	65,50	68,17
200	0,176	0,180	0,192	0,045	40,14	37,94	32,61	36,90
100	0,233	0,179	0,174	0,054	17,66	42,43	44,77	34,95
50	0,189	0,221	0,193	0,043	33,07	18,49	31,42	27,66
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218
IC₅₀ (µg/mL)					262,83	208,32	373,82	235,58 ± 38,54
ЕПСХ ИТА надземни део, суша								
800	0,076	0,077	0,079	0,059	92,25	91,70	90,64	91,53
400	0,116	0,100	0,116	0,051	70,09	77,29	70,09	72,49
200	0,145	0,140	0,139	0,058	60,05	62,57	63,07	61,90
100	0,172	0,172	0,187	0,053	45,41	45,41	38,49	43,10
50	0,188	0,189	0,178	0,048	35,83	35,23	40,09	37,05
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218
IC₅₀ (µg/mL)					130,93	120,47	140,78	130,73 ± 10,16
ИПСХ ИТА корен, суша								
800	0,109	0,140	0,120	0,050	72,75	58,44	67,89	66,36
400	0,143	0,159	0,146	0,048	56,51	49,13	54,86	53,50
200	0,153	0,166	0,172	0,048	51,93	46,01	43,26	47,06
100	0,225	0,183	0,187	0,046	17,80	36,97	35,37	30,05
50	0,179	0,190	0,193	0,046	39,08	34,04	32,75	35,29
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214				0,218

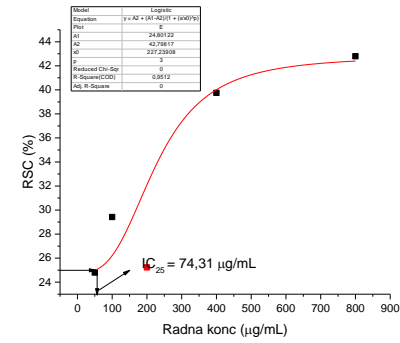
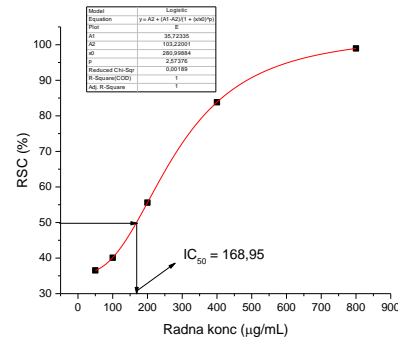
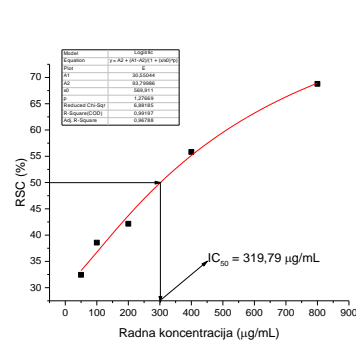
IC₅₀ (µg/mL)						198,28	381,16	307,62	344,39 ± 52,00
ИПСХ ИТА надземни део, суша									
800	0,078	0,071	0,074	0,062	92,57	95,46	94,17	94,07	
400	0,094	0,086	0,092	0,054	81,79	85,09	82,71	83,20	
200	0,133	0,138	0,140	0,051	62,39	60,09	59,17	60,55	
100	0,152	0,165	0,159	0,050	53,39	47,29	49,86	50,18	
50	0,168	0,178	0,191	0,049	45,50	40,78	35,00	40,43	
A_{kontrola}	0,211	0,226	0,221	0,214					0,218
IC₅₀ (µg/mL)						86,05	131,91	116,27	124,09 ± 11,06
ЕПСХ СРБ корен, суша									
800	0,109	0,108	0,102	0,054	73,588	72,04	72,91	75,82	
400	0,136	0,148	0,135	0,049	53,844	55,82	49,69	56,02	
200	0,153	0,153	0,151	0,048	46,633	46,43	46,02	47,45	
100	0,162	0,166	0,164	0,047	40,238	41,17	39,49	40,05	
50	0,169	0,173	0,182	0,056	39,201	42,14	39,95	35,51	
A_{kontrola}	0,168	0,206	0,208	0,204					0,196
IC₅₀ (µg/mL)					286,21	378,44	264,04		275,12 ± 15,67
ЕПСХ СРБ надземни део, суша									
800	0,082	0,083	0,073	0,075	96,58	95,77	100,92	97,76	
400	0,084	0,075	0,086	0,077	96,22	100,92	95,36	97,50	
200	0,119	0,123	0,127	0,057	68,52	66,43	64,29	66,41	
100	0,139	0,136	0,146	0,065	61,89	63,52	58,62	61,34	
50	0,158	0,151	0,173	0,062	51,22	54,85	43,37	49,81	
A_{kontrola}	0,168	0,206	0,208	0,204					0,196
IC₅₀ (µg/mL)					/	/	82,79		82,79
ИПСХ СРБ корен, суша									
800	0,073	0,079	0,075	0,065	96,38	93,06	94,95	94,80	
400	0,113	0,106	0,114	0,054	69,90	73,11	69,29	70,77	
200	0,138	0,138	0,142	0,055	57,65	58,06	55,87	57,19	
100	0,162	0,154	0,150	0,063	49,59	54,03	55,66	53,10	
50	0,161	0,168	0,159	0,050	43,37	39,54	44,34	42,41	
A_{kontrola}	0,168	0,206	0,208	0,204					0,196

Јована Мишковић
Докторска дисертација

IC₅₀ (µg/mL)					114,44	103,32	88,86	108,88 ± 7,86
ИПСХ СРБ надземни део, суша								
800	0,077	0,081	0,067	0,058	89,95	87,96	95,31	91,07
400	0,094	0,089	0,083	0,052	78,83	81,17	84,18	81,39
200	0,135	0,123	0,114	0,059	61,17	66,94	71,89	66,67
100	0,144	0,135	0,137	0,051	52,19	56,94	55,82	54,98
50	0,161	0,151	0,160	0,046	41,48	46,84	42,19	43,50
A _{kontrola}	0,168	0,206	0,208	0,204				0,196
IC₅₀ (µg/mL)					96,38	65,07	74,54	69,81 ± 6,70

Јована Мишковић
Докторска дисертација

График 8.17.-8.40. Зависност RSC (%) и радне концентрације ($\mu\text{g/mL}$) метанолних екстраката грашка *Pisum sativum* L. у оптималним условима и условима стреса – суше након биопрајминга езго и интраполисахаридима код DPPH теста (IC_{50} вредности)



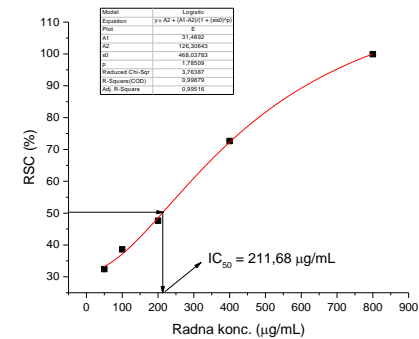
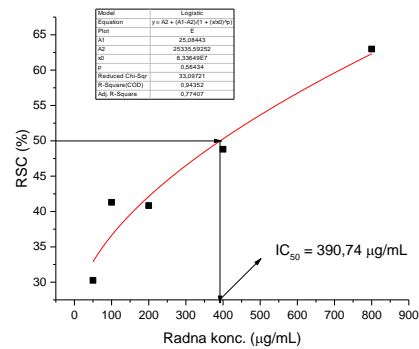
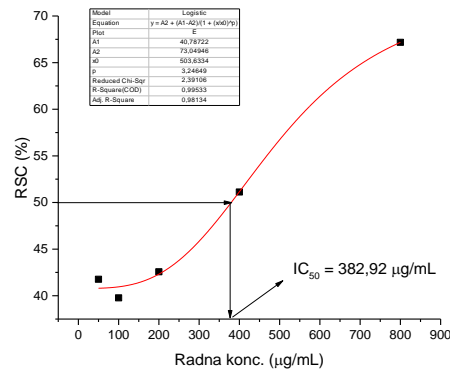
Контрола корен, оптимални услови (ОУ)

Контрола надземни део, ОУ

Хидропрајминг

корен,

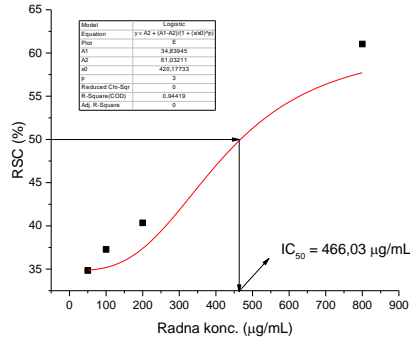
ОУ



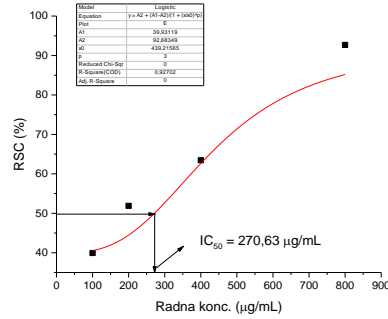
Хидропрајминг надземни део, ОУ

ЕПСХ ИТА корен, ОУ

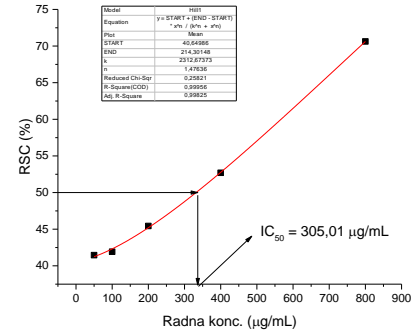
ЕПСХ ИТА надземни део, ОУ



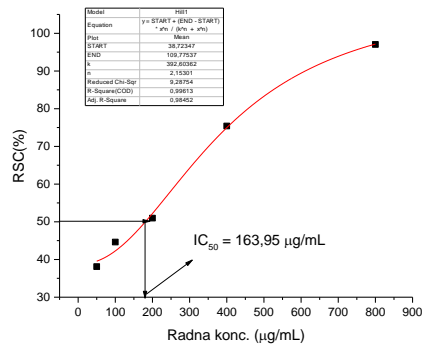
ИПСХ ИТА корен, ОУ



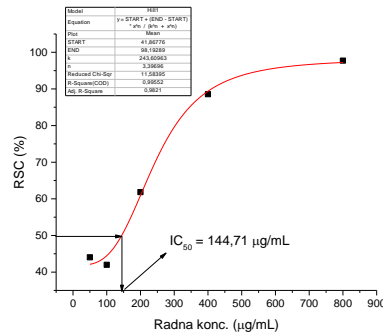
ИПСХ ИТА надземни део, ОУ



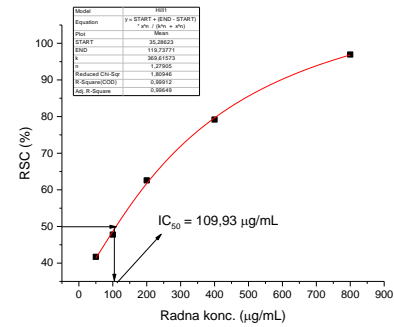
ЕПСХ СРБ корен, ОУ



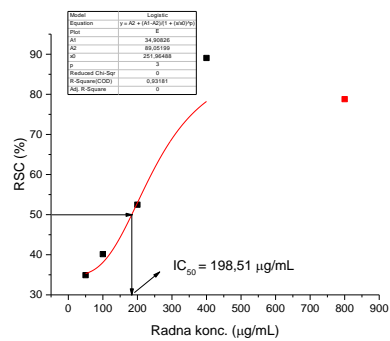
ЕПСХ СРБ надземни део, ОУ



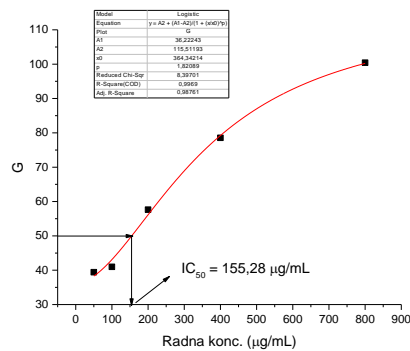
ИПСХ СРБ корен, ОУ



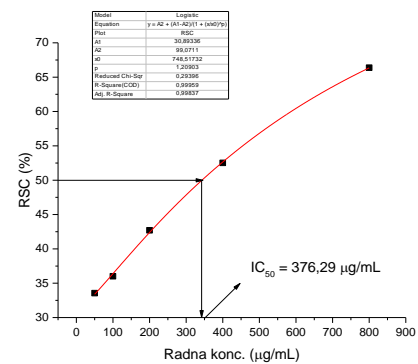
ИПСХ СРБ надземни део, ОУ



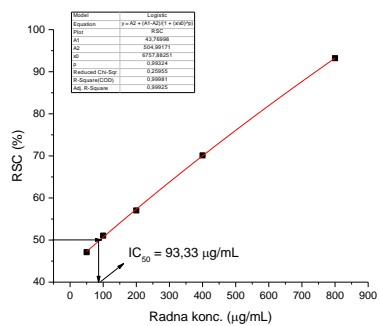
Контрола корен, суша



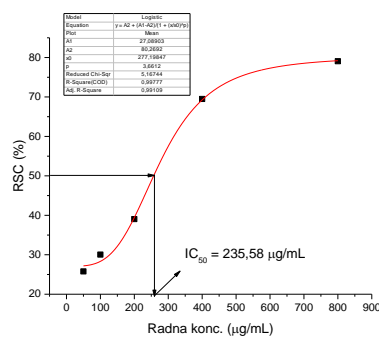
Контрола надземни део, суша



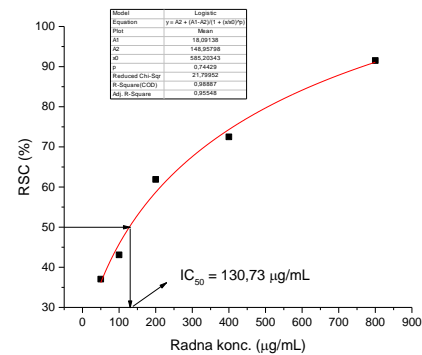
Хидропрајминг корен, суша



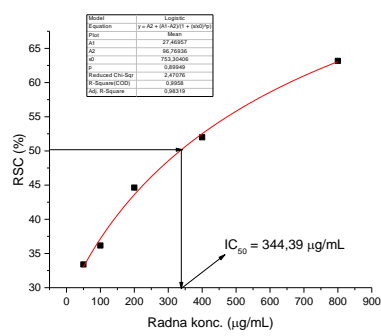
Хидропрајминг надземни део, суша



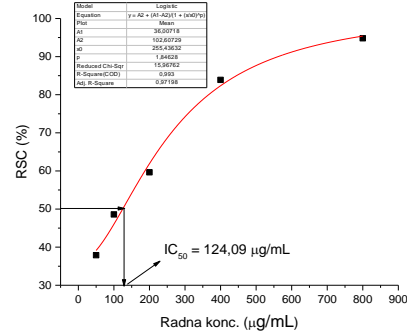
ЕПСХ ИТА корен, суша



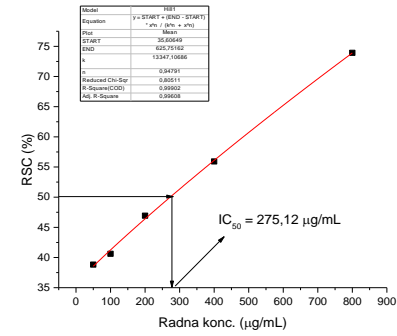
ЕПСХ ИТА надземни део, суша



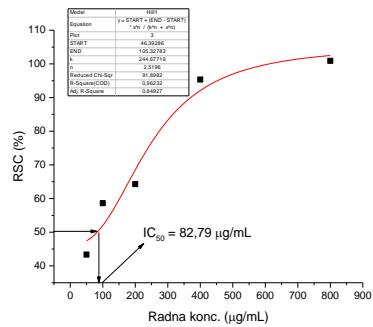
ИПСХ ИТА корен, суша



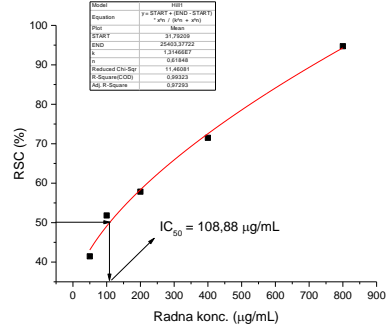
ИПСХ ИТА надземни део, суша



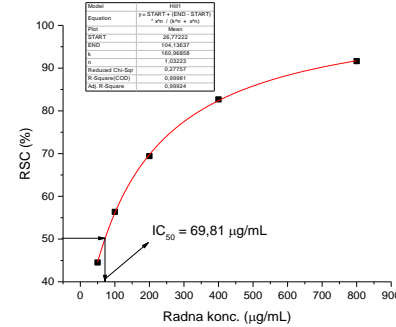
ЕПСХ СРБ корен, суша



ЕПСХ СРБ надземни део, суша



ИПСХ СРБ корен, суша



ИПСХ СРБ надземни део, суша

8.2.7. Инхибиција липидне пероксидације

Табела 8.19. Инхибиција липидне пероксидације метанолним екстрактима грашка *Pisum sativum* L. у оптималним условима и условима стреса – суше након биопрајминга ездо- и интраполисахаридима

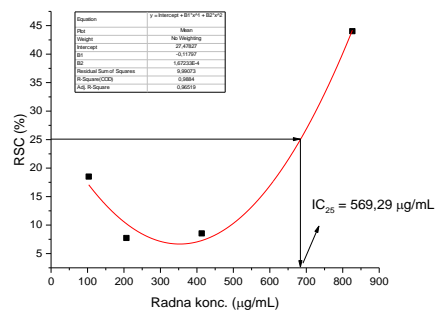
Радна конц. ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{kor}	RSC ₁ (%)	RSC ₂ (%)	RSC ₃ (%)	Средња вредност (%)
Контрола, надземни део, оптимални услови								
826,45	0,442	0,461	0,426	0,078	44,202	41,319	46,733	44,085
413,22	0,946	0,665	0,757	0,069	-34,555	8,543	-5,613	-10,542
206,61	0,841	0,735	0,608	0,070	-18,252	-1,948	17,408	-0,930
103,31	0,836	0,647	0,583	0,052	-20,307	8,635	18,512	2,280
A _{kontrola}	0,759	0,621	0,576					0,652
IC ₂₅ ($\mu\text{g/mL}$)					/	608,97	529,62	569,29 ± 56,10
Хидропрајминг, надземни део, оптимални услови								
826,45	0,361	0,412	0,446	0,084	57,485	49,586	44,463	50,511
413,22	0,455	0,475	0,349	0,069	40,874	37,699	57,132	45,235
206,61	0,532	0,546	0,434	0,071	29,325	27,193	44,433	33,650
103,31	0,511	0,707	0,815	0,055	30,000	-0,077	-16,610	4,438
A _{kontrola}	0,759	0,621	0,576					0,652
IC ₂₅ ($\mu\text{g/mL}$)					/	198,678	166,389	182,53 ± 22,83
ЕПСХ ИТА, надземни део, оптимални услови								
826,45	0,408	0,401	0,353	0,087	50,828	51,825	59,172	53,942
413,22	0,475	0,478	0,436	0,071	37,914	37,469	44,003	39,796
206,61	1,235	0,505	0,544	0,057	-80,675	31,319	25,322	-8,011
103,31	0,505	0,627	0,613	0,094	36,994	18,206	20,429	25,210
A _{kontrola}	0,759	0,621	0,576					0,652
IC ₂₅ ($\mu\text{g/mL}$)					/	209,29	187,55	198,42 ± 15,37
ИПСХ ИТА, надземни део, оптимални услови								
826,45	0,447	0,453	0,402	0,093	45,629	44,785	52,623	47,679
413,22	0,438	0,497	0,567	0,070	43,543	34,433	23,681	33,885
206,61	0,543	0,549	0,641	0,063	26,334	25,521	11,304	21,053
103,31	0,483	0,645	0,616	0,055	34,264	9,525	13,850	19,213

A_{kontrola}	0,759	0,621	0,576						0,652
IC₂₅									443,22 ±
(µg/mL)					/	420,657	465,775		31,90
ЕПСХ СРБ, надземни део, оптимални услови									
826,45	0,281	0,276	0,300	0,069	60,354	61,415	56,909	59,559	
413,22	0,325	0,362	0,307	0,061	50,764	43,855	54,078	49,565	
206,61	0,368	0,380	0,382	0,051	40,912	38,678	38,361	39,317	
103,31	0,433	0,456	0,369	0,044	27,616	23,371	39,628	30,205	
A_{kontrola}	0,471	0,582	0,558	0,127					0,537
IC₂₅									> 25
(µg/mL)									
ИПСХ СРБ, надземни део, оптимални услови									
826,45	0,281	0,272	0,277	0,076	61,862	63,631	62,663	62,719	
413,22	0,302	0,334	0,321	0,065	55,866	49,814	52,272	52,651	
206,61	0,391	0,345	0,340	0,059	38,138	46,723	47,709	44,190	
103,31	0,441	0,441	0,431	0,053	27,784	27,747	29,553	28,361	
A_{kontrola}	0,471	0,582	0,558	0,127					0,537
IC₂₅					98,402	64,879	58,831	61,86 ± 4,28	
(µg/mL)									
Контрола, надземни део, суша									
826,45	0,389	0,345	0,389	0,130	60,276	67,071	60,322	62,556	
413,22	0,471	0,448	0,442	0,075	39,325	42,899	43,834	42,019	
206,61	0,552	0,525	0,501	0,062	24,847	29,003	32,761	28,870	
103,31	0,700	0,855	0,614	0,051	0,521	-23,298	13,712	-3,021	
A_{kontrola}	0,759	0,621	0,576						0,652
IC₂₅					253,062	155,280	195,552	175,42 ±	
(µg/mL)								28,48	
Хидропрајминг, надземни део, суша									
826,45	0,380	0,424	0,410	0,084	54,617	47,791	49,939	50,782	
413,22	0,560	0,459	0,585	0,069	24,770	40,261	20,936	28,655	
206,61	0,556	0,756	0,527	0,058	23,666	-6,979	28,160	14,949	
103,31	0,745	0,774	0,630	0,055	-5,874	-10,307	11,794	-1,462	
A_{kontrola}	0,759	0,621	0,576						0,652
IC₂₅					217,837	/	229,483	223,66 ±	
(µg/mL)								8,23	
ЕПСХ ИТА, надземни део, суша									
826,45	0,354	0,461	0,398	0,076	49,709	57,454	41,028	50,644	

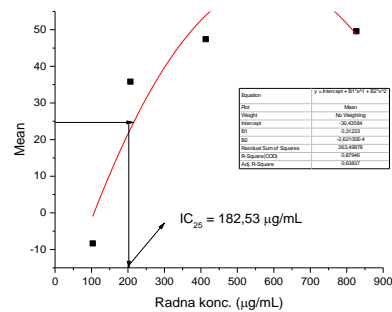
Јована Мишковић
Докторска дисертација

413,22	0,517	0,468	0,495	0,061	33,655	30,015	37,561	33,390
206,61	0,555	0,563	0,649	0,265	50,312	55,583	54,218	41,135
103,31	0,556	0,720	0,586	0,064	24,540	-0,629	19,939	14,617
A _{kontrola}	0,759	0,621	0,576					
IC₂₅ (µg/mL)					116,616	/	211,052	163,83 ± 66,78
ИПСХ ИТА, надземни део, суша								
826,45	0,397	0,395	0,319	0,116	56,902	57,178	68,804	60,961
413,22	0,456	0,638	0,444	0,091	43,988	16,074	45,813	35,291
206,61	0,589	0,778	0,490	0,066	19,893	-9,187	35,077	15,261
103,31	0,436	0,570	0,892	0,063	42,929	22,377	-27,055	12,751
A _{kontrola}	0,759	0,621	0,576					0,652
IC₂₅ (µg/mL)					243,079	502,913	301,312	272,20 ± 41,18
ЕПСХ СРБ, надземни део, суша								
826,45	0,303	0,283	0,297	0,081	58,752	62,421	59,888	60,354
413,22	0,348	0,319	0,323	0,065	47,281	52,793	51,918	50,664
206,61	0,366	0,403	0,360	0,058	42,607	35,717	43,724	40,683
103,31	0,450	0,518	0,426	0,049	25,289	12,607	29,683	22,526
51,65	0,489	0,447	0,519	0,048	17,821	25,717	12,272	18,603
A _{kontrola}	0,471	0,582	0,558	0,127				0,537
IC₂₅ (µg/mL)					88,527	151,369	83,390	85,96 ± 3,63
ИПСХ СРБ, надземни део, суша								
826,45	0,290	0,295	0,281	0,076	60,130	59,181	61,788	60,366
413,22	0,295	0,305	0,295	0,058	55,922	54,060	55,866	55,282
206,61	0,356	0,332	0,335	0,049	42,812	47,281	46,685	45,593
103,31	0,424	0,405	0,361	0,042	28,957	32,346	40,689	33,998
51,65	0,468	0,455	0,455	0,045	21,304	23,613	23,669	22,862
A _{kontrola}	0,471	0,582	0,558	0,127				0,537
IC₂₅ (µg/mL)					79,381	60,684	53,135	56,91 ± 5,34

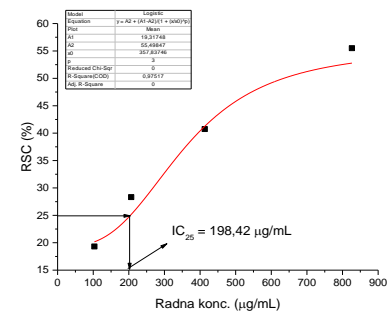
График 8.41.-8.51. Зависност RSC (%) и радне концентрације ($\mu\text{g/mL}$) метанолних екстраката грашка *Pisum sativum* L. у оптималним условима и условима стреса – суше након биопрајминга езго- и интраполисахаридима код теста инхибиције липидне пероксидације (IC_{25} вредности)



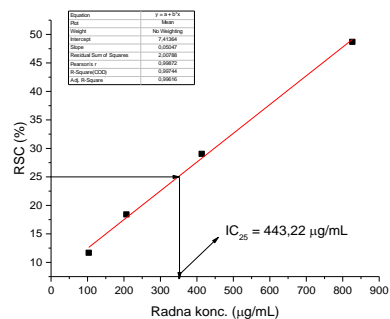
Контрола, надземни део, ОУ



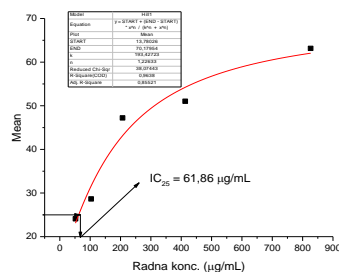
Хидропрајминг, надземни део, ОУ



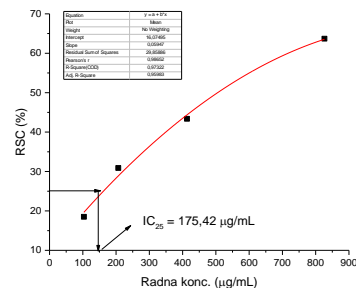
ЕПСХ ИТА, надземни део, ОУ



ИПСХ ИТА, надземни део, ОУ



ИПСХ СРБ, надземни део, ОУ



Контрола, надземни део, суша

8.3. Детерминација антимикуробне активности

Табела 8.20. Антибиограм (опсег испитиваних концентрација је 0,03 до 0,5 mg/mL).

Антибиотици	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	МИК (mg/mL)	МБК (mg/mL)	МИК (mg/mL)	МБК (mg/mL)	МИК (mg/mL)	МБК (mg/mL)	МИК (mg/mL)	МБК (mg/mL)
Канамицин	0,25	0,25	0,125	0,5	0,063	0,125	0,5	0,5
Хлорамфеникол	P	P	0,250	0,5	0,250	0,250	P	P
Ампицилин	0,25	0,50	0,125	0,5	0,125	0,125	P	P
Стрептомицин	0,5 0	/	0,250	0,5	0,030	0,030	P	P

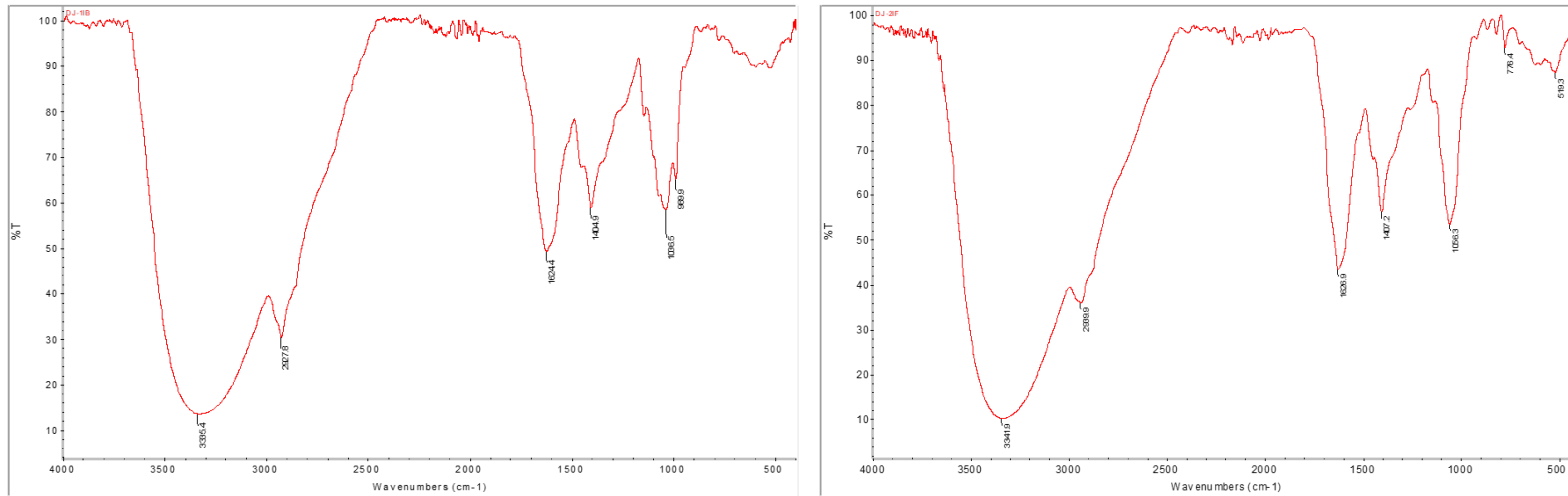
8.4. Детерминација антиацетилхолинестеразне активности

Табела 8.21. Инхибиција ензима ацетилхолинестеразе ПСХ екстрактима

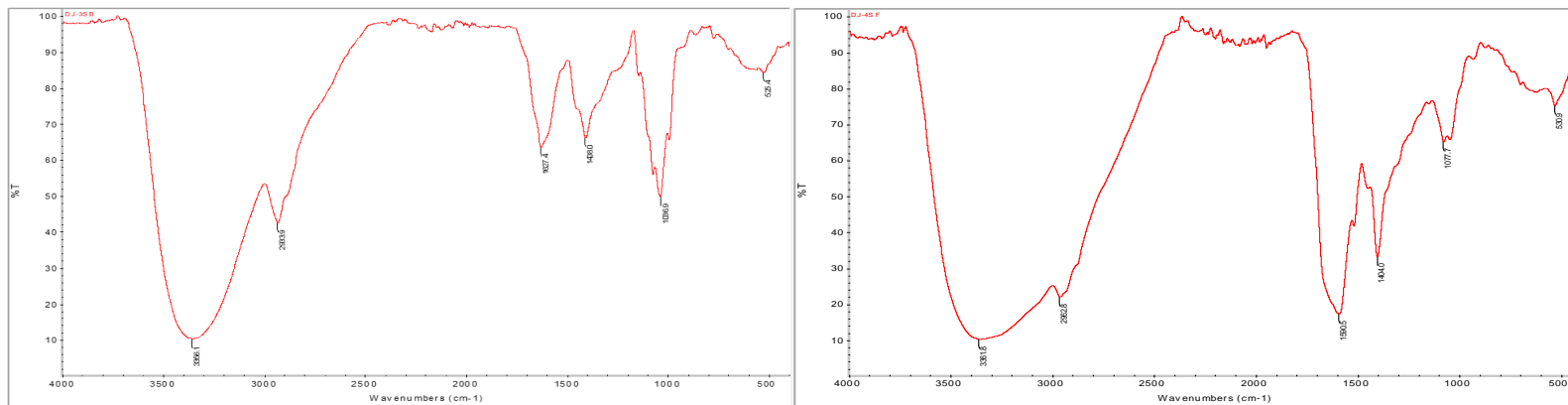
Тип екстракта и инкубациони период	<i>S. commune</i> ИТ	<i>S. commune</i> СРБ
	ПСХ екстракти IC ₉₀ (µg/mL)	
Биомаса 7 дана	276,0	202,2
Филтрат 7 дана	243,7	202,4
Биомаса 14 дана	229,8	156,5
Филтрат 14 дана	747,5	250,1
Биомаса 21 дан	334,3	231,8
Филтрат 21 дан	286,5	279,7
Биомаса 28 дана	298,9	79,7
Филтрат 28 дана	290,9	85,5
	ЕТ екстракти IC ₅₀ (µg/mL)	
Биомаса 7 дана	5,7	6,1
Филтрат 7 дана	0,9	5,2
Биомаса 14 дана	1,7	2,7
Филтрат 14 дана	0,8	1,8
Биомаса 21 дан	3,6	3,9
Филтрат 21 дан	1,3	2,0
Биомаса 28 дана	2,9	3,5
Филтрат 28 дана	1,7	0,9

8.5. Хемијска карактеризација

8.5.1. FTIR анализа екстракта врсте *S. commune* Fr.

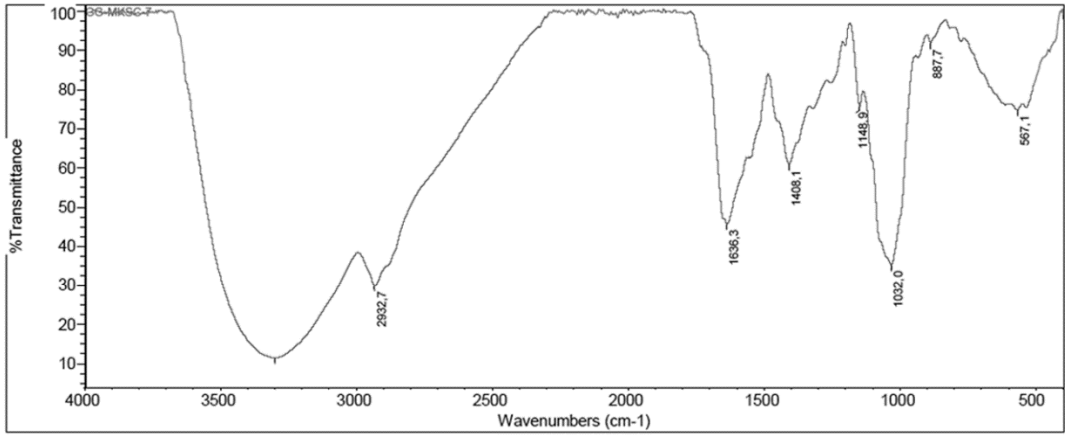
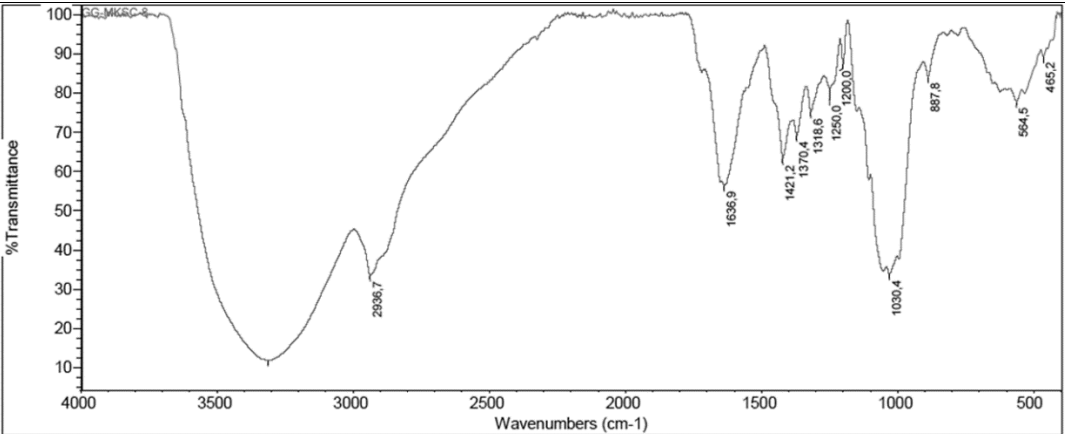
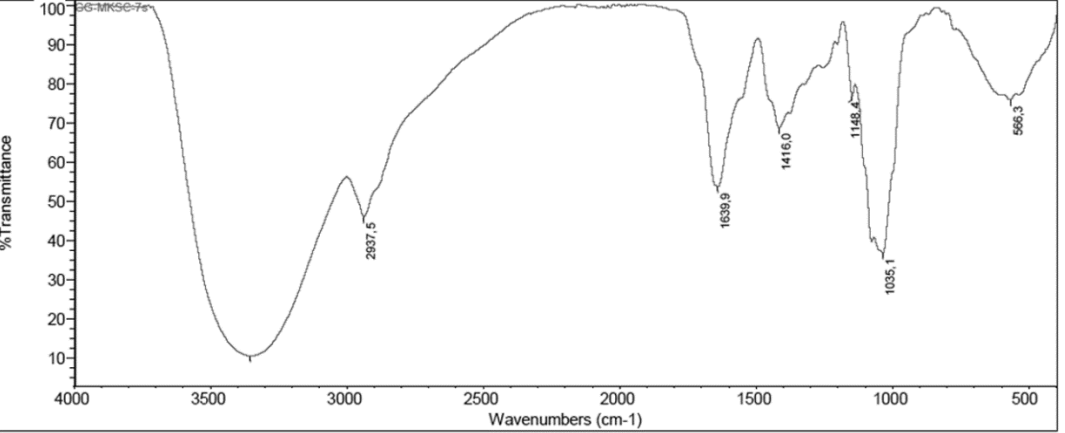


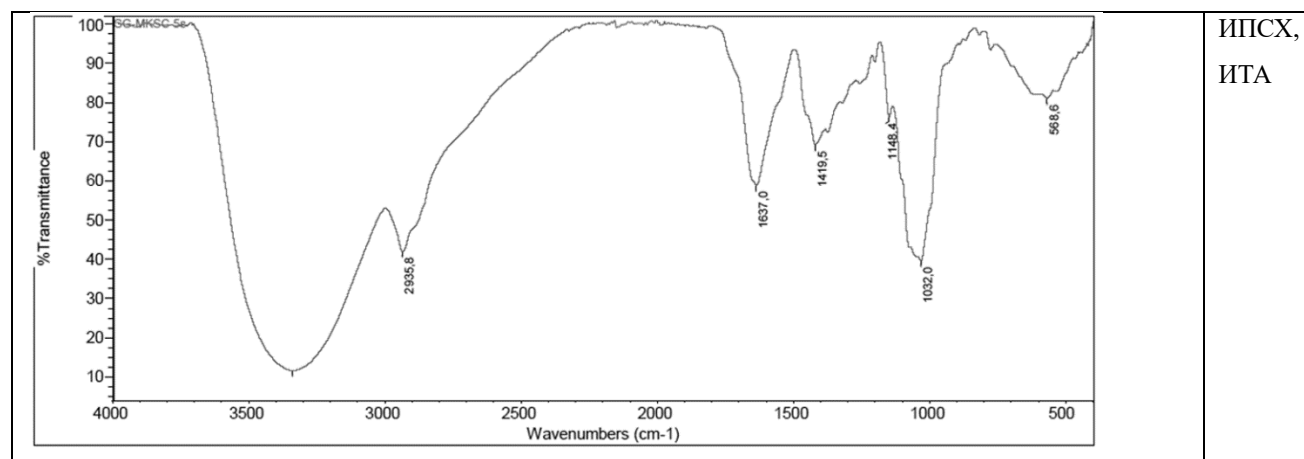
Слика 8.1. FTIR спектар ЕТ екстракта БМ и Ф инкубираних 14 дана, ИТА сој



Слика 8.2. FTIR спектар ЕТ екстракта БМ и Ф инкубираних 14 дана, СРБ сој

8.5.2. FTIR анализа ЕПСХ и ИПСХ изолованих из врсте *S. commune* Fr.

 <p>FTIR spectrum of IPCH, SRB (Sample 7). The plot shows % Transmittance on the y-axis (0 to 100) and Wavenumbers (cm-1) on the x-axis (4000 to 500). Key absorption bands are labeled with their wavenumbers: 2932.7, 1636.3, 1408.1, 1148.9, 1032.0, and 887.7 cm-1.</p>	ИПСХ, СРБ
 <p>FTIR spectrum of EPCH, SRB (Sample 8). The plot shows % Transmittance on the y-axis (0 to 100) and Wavenumbers (cm-1) on the x-axis (4000 to 500). Key absorption bands are labeled with their wavenumbers: 2936.7, 1636.9, 1421.2, 1370.4, 1318.6, 1250.0, 1200.0, 1030.4, 887.8, 564.5, and 465.2 cm-1.</p>	ЕПСХ, СРБ
 <p>FTIR spectrum of IPCH, SRB (Sample 7). The plot shows % Transmittance on the y-axis (0 to 100) and Wavenumbers (cm-1) on the x-axis (4000 to 500). Key absorption bands are labeled with their wavenumbers: 2937.5, 1639.9, 1416.0, 1148.4, 1035.1, and 566.3 cm-1.</p>	ИПСХ, СРБ



Слика 8.3. FTIR спектри ЕПСХ и ИПСХ узрака врсте *S. commune* Fr.

8.5.3. Укупан садржај протеина и угљених хидрата

Табела 8.22. Упоредни приказ укупног садржаја протеина и угљених хидрата у филтрату ИТА и СРБ сојева врсте *S. commune* Fr.

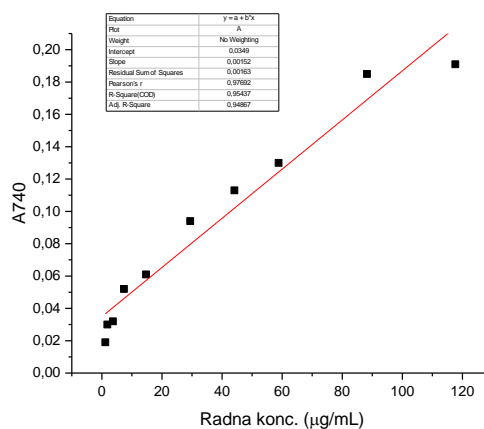
Екстракт/филтрат	Укупан садржај протеина ± СД (mg ек. BSA /g с.м.)		Укупан садржај угљених хидрата ± СД (mg ек. глюкозе/g с.м.)	
	ИТА	СРБ	ИТА	СРБ
3 дана	232,00 ± 16,89	144,26 ± 15,12	X	X
7 дана	171,90 ± 23,21	158,46 ± 5,70	X	530,55 ± 80,66
9 дана	107,88 ± 6,93	163,33 ± 23,11	528,60 ± 15,16	582,00 ± 0,00
12 дана	99,53 ± 5,39	219,88 ± 0,26	504,49 ± 12,09	112,10 ± 4,12
14 дана	175,12 ± 11,25	171,39 ± 4,97	502,97 ± 61,24	586,85 ± 0,00
18 дана	233,24 ± 22,46	116,16 ± 7,41	383,24 ± 43,00	370,42 ± 11,81
21 дан	29,11 ± 25,04	87,65 ± 15,31	55,99 ± 5,51	480,98 ± 81,15
24 дана	100,37 ± 16,83	X	460,89 ± 3,38	X

28 дана $182,81 \pm 23,63$ $78,53 \pm 7,57$ $117,31 \pm 8,84$ $482,77 \pm 6,02$

Табела 8.23. Калибрациона крива албумина (Bovine Serume Albumin – BSA)

Почетна конц. BSA (mg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{sr} -A _{kor} (740 nm)
2	1,113	1,094	1,124	1,110	0,695
1,5	0,949	0,956	0,949	0,951	0,536
1	0,781	0,813	0,700	0,765	0,349
0,75	0,734	0,755	0,777	0,755	0,340
0,5	0,637	0,634	0,591	0,621	0,205
0,25	0,486	0,471	0,472	0,476	0,061
0,125	0,466	0,443	0,443	0,451	0,035
A _{kontrola} (H ₂ O)	0,137	0,167	0,168	0,208	0,184

График 8.52. Калибрациона крива за одређивање садржаја протеина у испитиваним екстрактима (зависност очитане апсорбанце од концентрације BSA)



Табела 8.24. Укупан садржај протеина у филтрату ИТА и СРБ сојева врсте *S. commune Fr.*

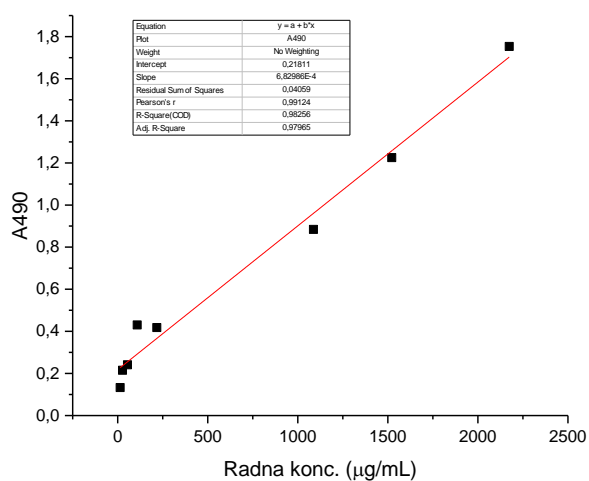
Екстракт	Радна конц. BSA (µg/mL)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A _{sr} – A _{kor}	mg ек. BSA/g с.м.		Средња вредност ± СД (mg ек. BSA/g с.м.)
Филтрат 3 дана ИТ										
ЕТ	2189,54	0,565	0,829	0,910	0,870	0,049	0,821	220,06	220,06	232,00 ± 16,89
Филтрат 7 дана ИТ										
ЕТ	2189,54	0,720	0,609	0,459	0,665	0,048	0,617	188,32	155,49	171,90 ± 23,21
Филтрат 9 дана ИТ										
ЕТ	2189,54	0,778	0,812	0,986	0,795	0,046	0,749	102,98	112,77	107,88 ± 6,93
Филтрат 12 дана ИТ										
ЕТ	2189,54	0,754	0,748	0,782	0,762	0,047	0,715	95,54	97,39	99,53 ± 5,39
Филтрат 14 дана ИТ										
ЕТ	2189,54	0,679	0,459	0,733	0,706	0,078	0,628	167,17	183,08	175,12 ± 11,25
Филтрат 18 дана ИТ										
ЕТ	2189,54	0,825	0,933	0,614	0,879	0,054	0,825	217,35	249,12	233,24 ± 22,46
Филтрат 21 дан ИТ										
ЕТ	2189,54	0,776	0,933	0,656	0,716	0,047	0,669	46,82	11,40	29,11 ± 25,04
Филтрат 24 дана ИТ										
ЕТ	2189,54	0,767	0,539	0,620	0,580	0,206	0,373	88,48	112,27	100,37 ± 16,83
Филтрат 28 дана ИТ										
ЕТ	2189,54	0,645	0,474	0,759	0,702	0,048	0,654	166,11	199,52	182,81 ± 23,63

Филтрат 3 дана СРБ										
ЕТ	2189,54	0,898	0,731	0,658	0,694	0,172	0,523	154,96	133,57	144,26 ± 15,12
Филтрат 7 дана СРБ										
ЕТ	2189,54	0,633	0,564	0,606	0,619	0,049	0,571	162,49	154,43	158,46 ± 5,70
Филтрат 9 дан СРБ										
ЕТ	2189,54	0,726	0,454	0,615	0,670	0,083	0,587	179,67	146,99	163,33 ± 23,11
Филтрат 12 дана СРБ										
ЕТ	2189,54	0,853	0,855	0,853	0,854	0,074	0,780	219,79	219,67	219,88 ± 0,26
Филтрат 14 дана СРБ										
ЕТ	2189,54	0,658	0,682	0,581	0,670	0,055	0,615	167,87	174,90	171,39 ± 4,97
Филтрат 18 дана СРБ										
ЕТ	2189,54	0,721	0,829	0,793	0,811	0,050	0,761	121,39	110,92	116,16 ± 7,41
Филтрат 21 дан СРБ										
ЕТ	2189,54	0,504	0,719	0,793	0,756	0,067	0,689	76,83	98,48	87,65 ± 15,31
Филтрат 28 дана СРБ										
ЕТ	2189,54	0,719	0,796	0,683	0,733	0,046	0,687	83,89	73,18	78,53 ± 7,57

Табела 8.25. Калибрациона крива глукозе (ГЛУ)

Почетна конц. ГЛУ (mg/mL)	Радна конц. ГЛУ ($\mu\text{g/mL}$)	A_1	A_2	A_3	A_{sr}	A_{kor}	$A_{sr}-A_{kor}$ (490 nm)
0	2173,91	2,110	1,315	1,975	1,799	0,046	1,753
7	1521,74	1,375	1,430	1,011	1,270	0,045	1,225
5	1086,96	0,701	1,290	0,784	0,926	0,042	0,884
1	217,39	0,372	0,536	0,461	0,460	0,042	0,418
0,5	108,70	0,453	0,432	0,572	0,478	0,048	0,430
0,25	54,35	0,287	0,320	0,265	0,291	0,051	0,241
0,125	27,17	0,208	0,347	0,230	0,262	0,047	0,215
0,0625	13,59	0,143	0,235	0,245	0,207	0,074	0,133
$A_{kontrola}$ (H_2O)	/	0,137	0,167	0,168	0,208	/	0,184

График 8.53. Калибрациона крива за одређивање садржаја угљених хидрата у испитиваним екстрактима (зависност очитане апсорбанце од концентрације глукозе)



Табела 8.26. Укупан садржај угљених хидрата у филтрату врсте *S. commune* Fr.

Екстракт	Радна конц. АЛБ ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A _{sr} – A _{kor}	mg ек. АЛБ/g с.м.		Средња вредност \pm СД (mg ек. албумина/g с.м.)
Филтрат 3 дана ИТ										
ЕТ	8091,79	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Филтрат 7 дана ИТ										
ЕТ	8091,79	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Филтрат 9 дана ИТ										
ЕТ	8091,79	6,000	3,519	3,640	3,579	0,396	3,184	517,88	539,32	528,60 \pm 15,16
Филтрат 12 дана ИТ										
ЕТ	8091,79	6,000	3,389	3,486	3,438	0,391	3,046	495,94	513,04	504,49 \pm 12,09
Филтрат 14 дана ИТ										
ЕТ	8091,79	6,000	3,751	3,259	3,505	0,467	3,038	546,27	459,66	502,97 \pm 61,24
Филтрат 18 дана ИТ										
ЕТ	8091,79	3,629	2,959	2,613	2,786	0,428	2,358	413,64	352,83	383,24 \pm 43,00
Филтрат 21 дан ИТ										
ЕТ	8091,79	1,108	1,064	0,730	0,968	0,585	0,382	59,88	52,09	55,99 \pm 5,51
Филтрат 24 дана ИТ										
ЕТ	8091,79	3,834	3,180	3,207	3,194	0,395	2,799	458,50	463,28	460,89 \pm 3,38
Филтрат 28 дана ИТ										
ЕТ	8091,79	1,314	1,317	1,229	1,287	0,437	0,849	122,19	107,10	117,31 \pm 8,84
Филтрат 3 дана СРБ										
ЕТ	8091,79	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Филтрат 7 дана СРБ										

ЕТ	8091,79	6,000	6,000	3,320	3,643	0,449	3,194	587,59	473,51	530,55 ± 80,66
Филтрат 9 дан СРБ										
ЕТ	8091,79	6,000	6,000	3,924	3,924	0,438	3,486	582,00	/	582,00 ± 0,00
Филтрат 12 дана СРБ										
ЕТ	8091,79	1,290	1,526	1,257	1,358	0,454	0,903	115,02	109,18	112,10 ± 4,12
Филтрат 14 дана СРБ										
ЕТ	8091,79	6,000	6,000	3,890	3,890	0,376	3,514	586,85	/	586,85 ± 0,00
Филтрат 18 дана СРБ										
ЕТ	8091,79	2,717	3,686	2,622	2,670	0,384	2,286	378,77	362,07	370,42 ± 11,81
Филтрат 21 дан СРБ										
ЕТ	8091,79	3,665	6,000	3,013	3,339	0,426	2,913	538,36	423,60	480,98 ± 81,15
Филтрат 28 дана СРБ										
ЕТ	8091,79	3,349	6,000	3,301	3,325	0,402	2,923	487,03	478,52	482,77 ± 6,02

ПСХ екстракти
ИТА Ф 7
ИТА М14
СРБ Ф7
ИТА М 7
ЕТ екстракти
ИТА Ф 14
ИТА Ф 21
ИТА М 14
ИТА М 21
ИТА М 28
СРБ Ф 7
СРБ Ф 14
СРБ Ф 21
СРБ Ф 28
СРБ М 7
СРБ М 14
СРБ М 21

Табела 8.28. Одређене концентрације фенолних једињења применом LC-MS/MS технике у испитиваним метанолним екстрактима грашка *P. sativum* L. (ng/mg с.м.)

Кверцетрин	Querc-3-O-Glc + Gal	Аментофлавонон	Апигин	Рутин
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<1,5	<3	48,73	<6	<0,75
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<1,5	<3	<24,5	<6	<0,75
<3	<6	<12	<0,75	<12
<3	<6	<12	1,19	<12
<3	<6	<12	2,72	<12
<3	<6	<12	2,46	<12
<3	<6	<12	1,11	<12
<3	<6	<12	1,48	<12
<3	<6	<12	2,22	<12
<3	<6	<12	2,70	<12

Хлорогенска	Магаиризино л	Секоизолари циретинол	Апи – 7-0 - Glc	Витексин	Бајкалин	Кам-3-О- Glc	Лут-7-О-Glc
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<12	<0,75	<6	<24,5	<12	<24,5
<24,5	<49	<49	<0,75	<0,75	<24,5	4,40	<3
<24,5	<49	<49	1,00	1,03	<24,5	6,22	<3
<24,5	<49	<49	3,18	3,45	<24,5	13,09	<3
<24,5	<49	<49	2,77	2,73	<24,5	10,75	<3
<24,5	<49	<49	0,94	1,05	<24,5	3,37	<3
<24,5	<49	<49	1,06	1,31	<24,5	4,83	<3
<24,5	<49	<49	3,47	2,88	<24,5	10,97	<3
<24,5	<49	<49	2,91	2,58	<24,5	10,60	<3

Нарингенин	Лутеолин	Камферол	Епикатехин	Кризоериол	Кверцетин	Изорањетин	Мирицетин
3,24	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
1,63	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
1,71	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
2,40	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
2,27	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
3,05	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
4,14	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
2,10	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
2,14	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
1,59	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
2,14	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
1,76	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
2,86	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
2,45	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
2,49	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
1,55	<12	<24,5	<24,5	<12	<97,5	<6	<199,5
1,90	<1,5	<6	<49	<6	<24,5	<6	<97,5
2,17	<1,5	<6	<49	<6	<24,5	<6	<97,5
6,26	<1,5	<6	<49	<6	<24,5	<6	<97,5
3,43	<1,5	<6	<49	<6	<24,5	<6	<97,5
163	<1,5	<6	<49	<6	<24,5	<6	<97,5
1,90	<1,5	<6	<49	<6	<24,5	<6	<97,5
3,80	<1,5	<6	<49	<6	<24,5	<6	<97,5
3,94	<1,5	<6	<49	<6	<24,5	<6	<97,5

Ферула	Сирингинска	3,4- диметиоксид	Синапнска	Дадзеин	Апитенин	Генистеин	Бакалеин
<12	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
17,10	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
<12	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
17,83	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
<12	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
25,31	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
14,45	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
29,42	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
17,59	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
21,45	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
20,97	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
<12	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
<12	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
17,59	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
<49	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
<49	<12	<12	<49	<12	<6	<6	<195,5
<49	<49	<12	<49	<12	<1,5	<3	0
<49	<49	<12	<49	<12	1,60	<3	0
<49	<49	<12	<49	<12	<1,5	4,49	0
<49	<49	<12	<49	<12	<1,5	3,06	0
<49	<49	<12	<49	<12	<1,5	<3	0
<49	<49	<12	<49	<12	<1,5	<3	0
<49	<49	<12	<49	<12	<1,5	<3	0
<49	<49	<12	<49	<12	<1,5	3,67	0

р- кумаринска	Умбеллиферо н	о- кумаринска	Ванилинска	Гална	Ескулетин	Кафеа	Скополетин
10,85	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
10,23	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
10,64	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
27,13	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
7,45	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
24,68	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
7,31	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
24,56	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
10,14	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
19,96	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
7,13	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
15,01	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
8,22	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
9,19	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
7,25	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
14,65	<0,75	<12	<97,5	<97,5	<24,5	<24,5	<6
29,02	<3	<6	0	0	<0,75	0	<6
30,27	<3	<6	0	0	<0,75	0	<6
46,66	<3	<6	0	0	<0,75	0	<6
16,36	<3	<6	0	0	<0,75	0	<6
12,68	<3	<6	0	0	<0,75	0	<6
18,85	<3	<6	0	0	<0,75	0	<6
19,34	<3	<6	0	0	<0,75	0	<6
24,63	<3	<6	0	0	<0,75	0	<6

Формононет ин	Диосметин	Урсолан к.	Нарингин	Р – ОН бензоена	Циметна	Прогокатехи нска	Гентизинска
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	<24,5	<12
/	<1,5	/	/	<97,5	<12	60,15	<12
5,57	<1,5	18,86	1,64	<97,5	<12	<24,5	<12
6,36	2,23	28,24	11,77	<97,5	<12	<24,5	<12
25,47	<1,5	61,68	2,06	<97,5	<12	29,75	<12
7,54	<1,5	18,24	4,46	<97,5	<12	<24,5	<12
4,46	<1,5	19,00	4,80	<97,5	<12	<24,5	<12
3,30	<1,5	11,30	6,46	<97,5	<12	<24,5	<12
4,79	<1,5	18,93	4,13	<97,5	<12	<24,5	<12
5,16	<1,5	58,57	3,22	<97,5	<12	<24,5	<12

Екстракт/једињење	Лиқиритгени	Изолиқиритгени
К К ОУ	/	/
К НД ОУ	/	/
ХПК ОУ	/	/
ХП НД ОУ	/	/
ЕПСХ К ИТА ОУ	/	/
ЕПСХ НД ИТА ОУ	/	/
ИПСХ К ИТА ОУ	/	/
ИПСХ НД ИТА ОУ	/	/
К К СУША	/	/
К НД СУША	/	/
ХПК СУША	/	/
ХП НД СУША	/	/
ЕПСХ К ИТА СУША	/	/
ЕПСХ НД ИТА СУША	/	/
ИПСХ К ИТА СУША	/	/
ИПСХ НД ИТА СУША	/	/
ЕПСХ К СРБ ОУ	30,71	6,81
ЕПСХ НД СРБ СУША	28,64	6,71
ИПСХ К СРБ ОУ	61,92	15,43
ИПСХ НД СРБ ОУ	19,78	5,96
ЕПСХ К СРБ СУША	20,08	3,44
ЕПСХ НД СРБ СУША	19,38	4,92
ИПСХ К СРБ СУША	18,28	3,72
ИПСХ НД СРБ СУША	45,15	10,84

8.5.5. Congo red тест

Табела 8.29. Вредности апсорбанци анализираних ЕПСХ и ИПСХ код СРБ соја врсте *S. commune* Fr. на испитиваним таласним дужинама у зависности од концентрације раствора NaOH

Концентрација NaOH	A400 ЕПСХ СРБ	A440 ЕПСХ СРБ	A480 ЕПСХ СРБ	A520 ЕПСХ СРБ	A560 ЕПСХ СРБ	A600 ЕПСХ СРБ	A400 ИПСХ СРБ	A440 ИПСХ СРБ	A480 ИПСХ СРБ	A520 ИПСХ СРБ	A560 ИПСХ СРБ	A600 ИПСХ СРБ	A400 КОНТРОЛА	A440 КОНТРОЛА	A480 КОНТРОЛА	A520 КОНТРОЛА	A560 КОНТРОЛА	A600 КОНТРОЛА
0	0,378	0,536	0,774	0,720	0,400	0,042	0,698	1,108	1,532	1,040	0,642	0,232	1,216	1,972	3,092	2,920	1,102	0,102
0,1	0,476	0,766	1,180	1,094	0,434	0,186	0,572	0,864	1,246	1,130	0,454	0,074	0,740	1,248	1,958	1,770	0,668	0,056
0,2	0,354	0,572	0,884	0,832	0,334	0,052	0,522	0,758	1,140	1,036	0,444	0,064	0,512	0,882	1,362	1,220	0,468	0,038
0,3	0,350	0,620	0,954	0,898	0,334	0,050	0,478	0,736	1,080	1,030	0,398	0,044	0,498	0,930	1,436	1,200	0,446	0,032
0,4	0,366	0,648	0,620	0,958	0,370	0,022	0,508	0,698	1,026	0,948	0,462	0,09	0,514	0,966	1,444	1,204	0,456	0,026
0,5	0,370	0,652	1,002	0,914	0,396	0,022	0,558	0,806	1,192	1,092	0,480	0,088	0,496	0,936	1,376	1,166	0,440	0,024
0,6	0,500	0,884	1,330	1,164	0,516	0,050	0,588	0,824	1,240	1,140	0,560	0,096	0,400	0,646	1,078	0,930	0,350	0,014
0,7	0,268	0,486	0,764	0,686	0,274	0,040	0,430	0,610	0,896	0,830	0,412	0,094	0,418	0,780	1,166	0,976	0,346	0,020

Табела 8.30. Вредности апсорбанци анализираних ЕПСХ и ИПСХ код ИТ соја врсте *S. commune* Fr. на испитиваним таласним дужинама у зависности од концентрације раствора NaOH

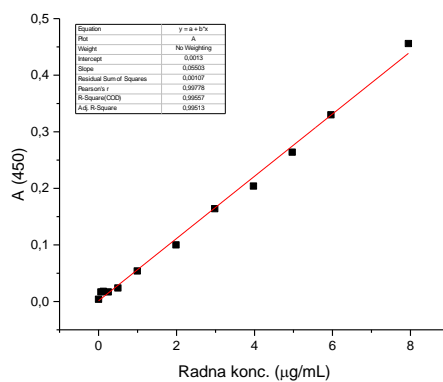
Концентрација NaOH	A400 ЕПСХ ИТ	A440 ЕПСХ ИТ	A480 ЕПСХ ИТ	A520 ЕПСХ ИТ	A560 ЕПСХ ИТ	A600 ЕПСХ ИТ	A400 ИПСХ ИТ	A440 ИПСХ ИТ	A480 ИПСХ ИТ	A520 ИПСХ ИТ	A400 КОНТРОЛА	A440 КОНТРОЛА	A480 КОНТРОЛА	A520 КОНТРОЛА
0	0,720	1,288	1,968	1,734	0,066	0,096	0,614	0,074	-0,52	-2,240	3,464	2,536	3,584	1,976
0,1	0,606	1,488	2,262	2,084	0,828	0,126	0,574	0,060	-0,824	0,000	3,608	2,944	4,040	1,808
0,2	0,518	1,37	2,066	1,824	0,724	0,106	0,750	0,258	0,616	-1,200	3,768	3,352	4,448	1,696
0,3	0,522	1,424	2,132	1,844	0,764	0,114	0,714	0,202	0,248	-1,504	3,608	3,128	3,968	1,048
0,4	0,458	1,518	2,256	1,874	0,766	0,118	0,586	0,110	-0,024	0,000	3,496	3,024	3,712	0,664
0,5	0,692	1,444	2,140	1,760	0,73	0,102	0,856	0,344	0,824	-0,992	3,520	3,080	3,736	0,600
0,6	0,536	1,420	2,088	1,726	0,718	0,104	0,804	0,316	0,864	-0,904	3,544	3,144	3,784	0,576
0,7	0,570	1,464	2,172	1,814	0,782	0,124	1,056	0,5	1,352	-0,432	3,568	3,144	3,752	0,560

8.5.6. Детерминација укупног садржаја флавоноида у метанолним екстрактима грашка
Pisum sativum L.

Табела 8.31. Калибрациона крива кверцетина

Почетна конц. кверцетина ($\mu\text{g/mL}$)	Радна конц. кверцетина ($\mu\text{g/mL}$)	A_1	A_2	A_3	A_{kor}	A_{sr}	$A(A_{\text{sr}}-A_{\text{kor}})(450\text{ nm})$
80	7,947	0,707	0,714	0,707	0,254	0,710	0,456
60	5,960	0,528	0,530	0,533	0,199	0,529	0,330
50	4,967	0,429	0,440	0,433	0,171	0,435	0,264
40	3,974	0,358	0,348	0,359	0,150	0,353	0,204
30	2,980	0,284	0,284	0,284	0,120	0,284	0,164
20	1,987	0,207	0,205	0,200	0,106	0,206	0,100
10	0,993	0,125	0,128	0,130	0,073	0,128	0,054
5	0,497	0,092	0,091	0,093	0,068	0,092	0,024
2,5	0,248	0,070	0,069	0,062	0,052	0,070	0,017
1,25	0,124	0,070	0,067	0,078	0,051	0,069	0,018
0,625	0,062	0,080	0,060	0,070	0,053	0,070	0,017
0	0,000	0,054	0,056	0,055	0,051	0,055	0,004

График 8.54. Калибрациона крива за одређивање укупног садржаја флавоноида (зависност очитане апсорбанце од концентрације кверцетина)



Табела 8.32. Укупан садржај флавоноида у метанолним екстрактима грашка *Pisum sativum* L. у оптималним условима и условима стреса – суше након биопрајминга езго и интраполисахаридима

Екстракт	Радна конц. АК ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{Sr}	A _{Kor}	A _{Sr} – A _{Kor}	Очитана конц. АК ($\mu\text{g/mL}$)	mg ек. АК/g с.м.	Средња вредност \pm СД (mg ек. АК/g с.м.)
Контрола, оптимални услови										
НД	1986,75	0,592	0,561	0,543	0,565	0,332	0,233	0,75	0,76	20,69 \pm 2,82
	993,38	0,277	0,323	0,302	0,301	0,235	0,066	1,57	1,58	
	496,69	0,099	0,105	0,105	0,103	0,131	-0,028	1,20	1,21	
К	1986,75	0,245	0,231	0,234	0,236	0,171	0,065	0,79	1,59	1,40 \pm 0,26
	993,38	0,139	0,135	0,149	0,141	0,127	0,014	1,06	2,13	
	496,69	0,180	0,195	0,199	0,191	0,135	0,056	1,14	2,29	
Хидропрајминг, оптимални услови										
НД	1986,75	0,528	0,466	0,489	0,494	0,398	0,096	1,18	1,19	1,11 \pm 0,12
	993,38	0,273	0,316	0,264	0,284	0,207	0,078	1,97	1,98	
	496,69	0,130	0,164	0,179	0,157	0,130	0,027	1,01	1,02	
К	1986,75	0,253	0,256	0,220	0,243	0,247	-0,003	0,04	0,09	0,12 \pm 0,05
	993,38	0,148	0,112	0,147	0,136	0,130	0,006	0,26	0,52	
	496,69	0,091	0,103	0,093	0,096	0,087	0,008	0,08	0,16	
ЕПСХ ИТА, оптимални услови										
НД	1986,75	0,459	0,519	0,505	0,494	0,427	0,068	1,26	1,27	1,37 \pm 0,09
	993,38	0,292	0,300	0,301	0,297	0,221	0,076	1,40	1,41	
	496,69	0,170	0,160	0,165	0,165	0,163	0,001	1,43	1,44	
К	1986,75	0,183	0,179	0,166	0,176	0,150	0,026	0,58	0,58	0,55 \pm 0,05
	993,38	0,108	0,113	0,110	0,110	0,126	-0,015	0,51	0,52	
	496,69	0,078	0,090	0,096	0,088	0,091	-0,003	0,27	0,27	
ИПСХ ИТА, оптимални услови										
НД	1986,75	0,403	0,322	0,543	0,423	0,448	-0,025	0,91	0,92	1,15 \pm 0,33
	993,38	0,289	0,322	0,292	0,301	0,237	0,064	1,52	1,53	
	496,69	0,194	0,246	0,149	0,196	0,135	0,061	0,98	0,99	
К	1986,75	0,149	0,160	0,169	0,159	0,144	0,015	0,06	0,03	0,17 \pm 0,06
	993,38	0,110	0,108	0,111	0,110	0,115	-0,005	0,26	0,13	
	496,69	0,083	0,086	0,094	0,088	0,091	-0,003	0,43	0,21	
ЕПСХ СРБ, оптимални услови										
НД	1986,75	0,579	0,650	0,589	0,606	0,445	0,161	0,84	0,85	0,85 \pm 0,00
	993,38	0,236	0,236	0,212	0,228	0,188	0,040	0,85	0,85	
	496,69	0,113	0,130	0,159	0,134	0,127	0,007	0,42	0,42	
К	1986,75	0,150	0,160	0,155	0,155	0,104	0,051	0,37	0,37	0,54 \pm 0,00
	993,38	0,098	0,107	0,107	0,104	0,076	0,028	0,53	0,53	
	496,69	0,070	0,078	0,076	0,074	0,068	0,006	0,53	0,54	
ИПСХ СРБ, оптимални услови										
НД	1986,75	0,346	0,409	0,376	0,377	0,270	0,107	1,36	0,68	0,82 \pm 0,19
	993,38	0,214	0,201	0,248	0,221	0,224	-0,003	2,50	1,26	
	496,69	0,132	0,111	0,134	0,126	0,115	0,011	1,90	0,96	
К	1986,75	0,358	0,395	0,397	0,383	0,254	0,129	1,86	0,94	1,12 \pm 0,25
	993,38	0,164	0,207	0,207	0,193	0,201	-0,009	2,54	1,28	
	496,69	0,117	0,119	0,130	0,122	0,123	-0,001	2,57	1,29	

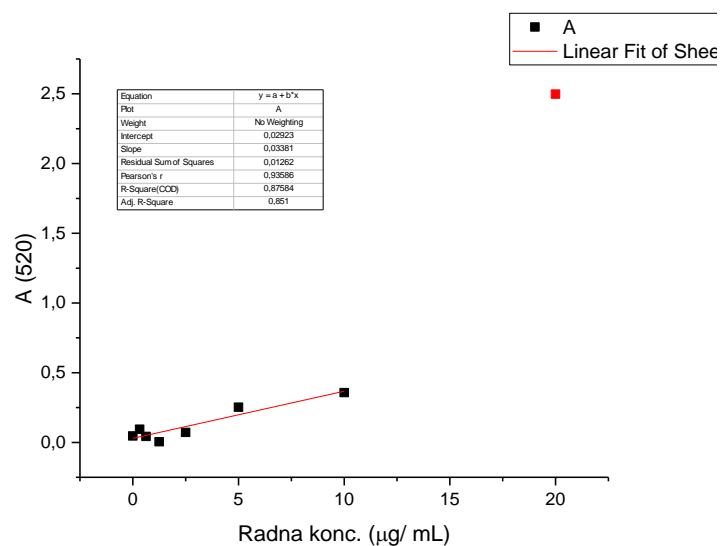
Контрола, суша										
НД	1986,75	0,461	0,468	0,398	0,442	0,431	0,012	1,18	1,19	1,32 ± 0,13
	993,38	0,362	0,376	0,369	0,369	0,296	0,073	1,43	1,44	
	496,69	0,202	0,224	0,227	0,218	0,177	0,040	1,31	1,32	
К	1986,75	0,193	0,203	0,201	0,199	0,171	0,029	0,33	0,34	0,73 ± 0,17
	993,38	0,131	0,146	0,159	0,145	0,111	0,034	0,61	0,61	
	496,69	0,085	0,103	0,112	0,100	0,086	0,014	0,85	0,85	
Хидропрајминг, суша										
НД	1986,75	0,472	0,494	0,509	0,491	0,328	0,163	0,10	0,10	0,11 ± 0,01
	993,38	0,369	0,380	0,390	0,380	0,269	0,111	0,11	0,11	
	496,69	0,220	0,228	0,212	0,220	0,168	0,052	0,12	0,12	
К	1986,75	0,231	0,226	0,247	0,234	0,187	0,047	0,67	0,68	0,74 ± 0,05
	993,38	0,159	0,163	0,164	0,162	0,120	0,042	0,75	0,76	
	496,69	0,119	0,124	0,109	0,117	0,096	0,021	0,77	0,77	
ЕПСХ ИТА, суша										
НД	1986,75	0,457	0,479	0,512	0,482	0,324	0,158	1,70	1,71	1,90 ± 0,52
	993,38	0,323	0,312	0,365	0,333	0,228	0,105	1,49	1,50	
	496,69	0,202	0,205	0,217	0,208	0,147	0,061	2,46	2,48	
К	1986,75	0,136	0,146	0,157	0,146	0,165	-0,019	0,33	0,33	0,30 ± 0,04
	993,38	0,118	0,114	0,110	0,114	0,098	0,016	0,27	0,27	
	496,69	0,118	0,091	0,082	0,097	0,086	0,011	0,19	0,19	
ИПСХ ИТА, суша										
НД	1986,75	0,568	0,557	0,542	0,556	0,368	0,188	2,43	2,45	2,09 ± 0,34
	993,38	0,365	0,328	0,342	0,345	0,230	0,115	1,77	1,78	
	496,69	0,203	0,227	0,212	0,214	0,167	0,047	2,02	2,03	
К	1986,75	0,218	0,198	0,236	0,217	0,128	0,090	1,04	1,04	1,02 ± 0,03
	993,38	0,153	0,128	0,151	0,144	0,095	0,049	0,59	0,59	
	496,69	0,106	0,093	0,114	0,104	0,081	0,023	0,99	1,00	
ЕПСХ СРБ, суша										
НД	1986,75	0,508	0,538	0,536	0,527	0,349	0,178	2,86	1,44	1,62 ± 0,15
	993,38	0,139	0,204	0,215	0,186	0,246	-0,060	3,41	1,72	
	496,69	0,120	0,137	0,115	0,124	0,118	0,006	3,36	1,69	
К	1986,75	0,152	0,177	0,159	0,163	0,131	0,032	0,36	0,37	0,43 ± 0,09
	993,38	0,111	0,099	0,116	0,109	0,096	0,013	0,81	0,82	
	496,69	0,073	0,085	0,081	0,080	0,079	0,001	0,49	0,49	
ИПСХ СРБ, суша										
НД	1986,75	0,329	0,360	0,383	0,357	0,244	0,113	0,32	0,64	1,03 ± 0,11
	993,38	0,208	0,212	0,221	0,214	0,197	0,017	0,55	1,11	
	496,69	0,125	0,138	0,134	0,133	0,107	0,026	0,47	0,95	
К	1986,75	0,239	0,260	0,254	0,251	0,185	0,066	0,17	0,34	0,38 ± 0,04
	993,38	0,147	0,164	0,160	0,157	0,137	0,021	0,20	0,41	
	496,69	0,102	0,104	0,112	0,106	0,092	0,015	0,35	0,70	

8.5.7. Детерминација садржаја пролина

Табела 8.33. Калибрациона крива L-пролина (Pro)

Почетна конц. Pro (mg/mL)	Радна конц. Pro (µg/mL)	A1	A2	A3	A _{sr}	A _{kor}	A _{sr} -A _{kor} (520 nm)
0,10000	20	0,446	2,653	2,847	2,750	0,252	2,498
0,05000	10	0,355	0,698	0,364	0,472	0,115	0,357
0,02500	5	0,401	0,540	0,319	0,420	0,167	0,253
0,01250	2,5	0,176	0,220	0,166	0,187	0,115	0,072
0,00625	1,25	0,123	0,237	0,077	0,180	0,175	0,004
0,00313	0,625	0,175	0,228	0,117	0,173	0,131	0,043
0,00163	0,325	0,216	0,227	0,143	0,195	0,101	0,094
0,00000	0	0,081	0,178	0,147	0,162	0,116	0,046

График 8.55. Калибрациона крива за одређивање укупног садржаја L-пролина (зависност очитане апсорбанце концентрација Pro)



Табела 8.34. Детерминација садржаја пролина у метанолним екстрактима грашка *Pisum sativum* L. у оптималним условима и условима стреса – суше након биопрајминга езго и интраполисахаридима

Екстракт	Радна конц. АК ($\mu\text{g/mL}$)	A ₁	A ₂	A ₃	A _{sr}	A _{kor}	A _{sr} - A _{kor}	Очитана конц. АК ($\mu\text{g/mL}$)	mg ек. АК/g с.м.	Средња вредност \pm СД (mg ек. АК/g с.м.)
Контрола, оптимални услови										
НД	83,33	16666	0,643	0,677	0,663	0,661	0,072	16,01	0,96	0,99 \pm 0,03
								17,02	1,02	
								16,60	1,00	
Хидропрајминг, оптимални услови										
НД	83,33	16666	1,142	1,252	1,190	1,194	0,175	27,74	1,66	1,76 \pm 0,10
								30,98	1,86	
								29,15	1,75	
ЕПСХ ИТА, оптимални услови										
НД	83,33	16666	0,922	0,911	0,735	0,856	0,151	21,93	1,32	1,31 \pm 0,01
								21,62	1,30	
								16,41	0,98	
ИПСХ ИТА, оптимални услови										
НД	83,33	16666	1,031	1,011	1,022	1,021	0,155	25,04	1,50	1,49 \pm 0,02
								24,47	1,47	
								24,79	1,49	
ЕПСХ СРБ, оптимални услови										
НД	16666	0,274	0,204	0,125	0,201	0,052	0,149	5,68	0,34	0,28 \pm 0,09
								3,62	0,22	
								1,29	0,08	
ИПСХ СРБ, оптимални услови										
НД	83,33	16666	0,247	0,260	0,210	0,239	0,054	4,86	0,29	0,28 \pm 0,05
								5,24	0,31	
								3,76	0,23	
Контрола, суша										
НД	83,33	16666	1,107	1,189	1,216	1,171	0,1540	27,33	1,64	1,81 \pm 0,03
								29,74	1,78	

								30,55	1,83	
Хидропрајминг, суша										
НД	16666	1,592	1,570	1,753	1,638	0,1820	1,456	40,85	2,45	2, 53± 0,18
								40,20	2,41	
								45,59	2,74	
ЕПСХ ИТА, суша										
НД	16666	1,031	1,118	1,116	1,088	0,1740	0,914	24,49	1,47	1,57 ± 0,09
								27,06	1,62	
								26,99	1,62	
ИПСХ ИТА, суша										
НД	16666	1,701	1,715	1,691	1,702	0,1450	1,557	45,16	2,71	2,71 ± 0,02
								45,59	2,74	
								44,87	2,69	
ЕПСХ СРБ, суша										
НД	83,33	16666	0,323	0,388	0,256	0,322	0,053	7,11	0,43	0,43 ± 0,12
								9,05	0,54	
								5,13	0,31	
ИПСХ СРБ, суша										
НД	16666	0,924	0,620	0,874	0,806	0,055	0,750	24,82	1,49	1,44 ± 0,06
								15,84	0,95	
								23,35	1,40	

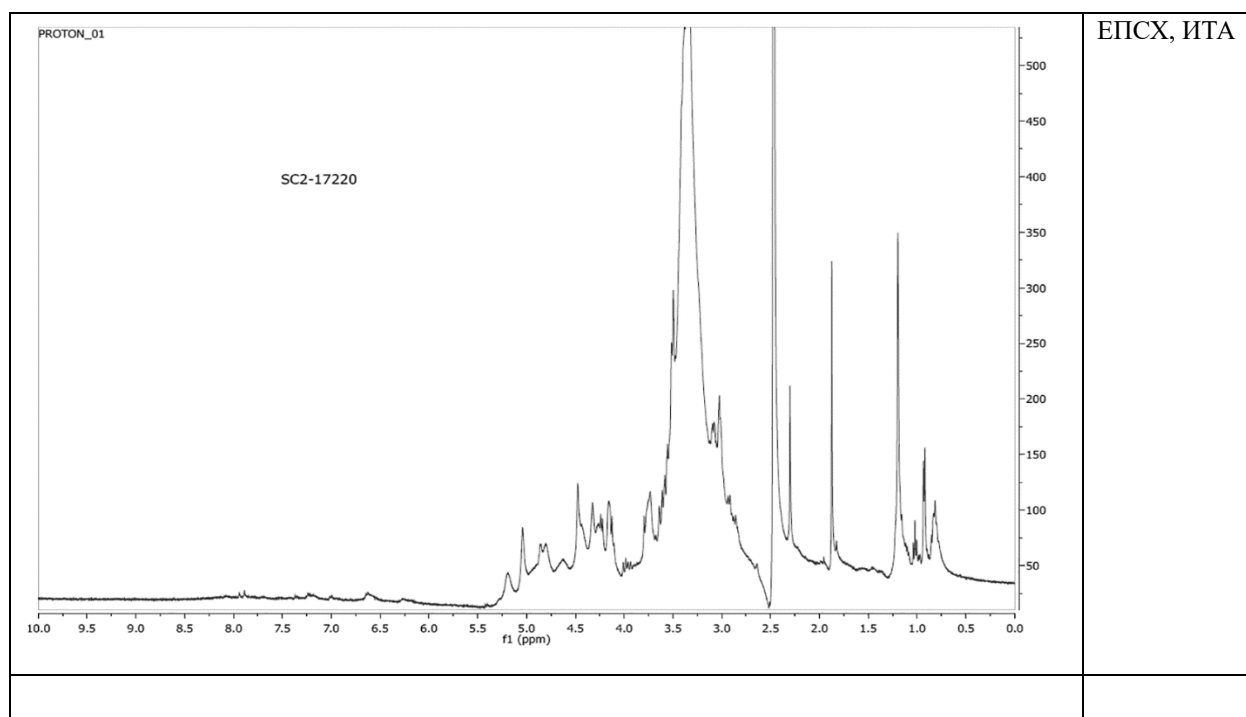
8.5.8. Елементална органска микроанализа

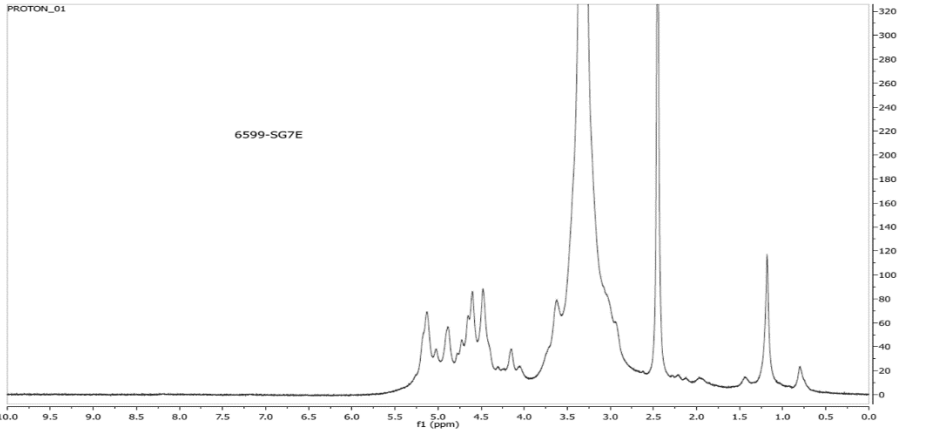
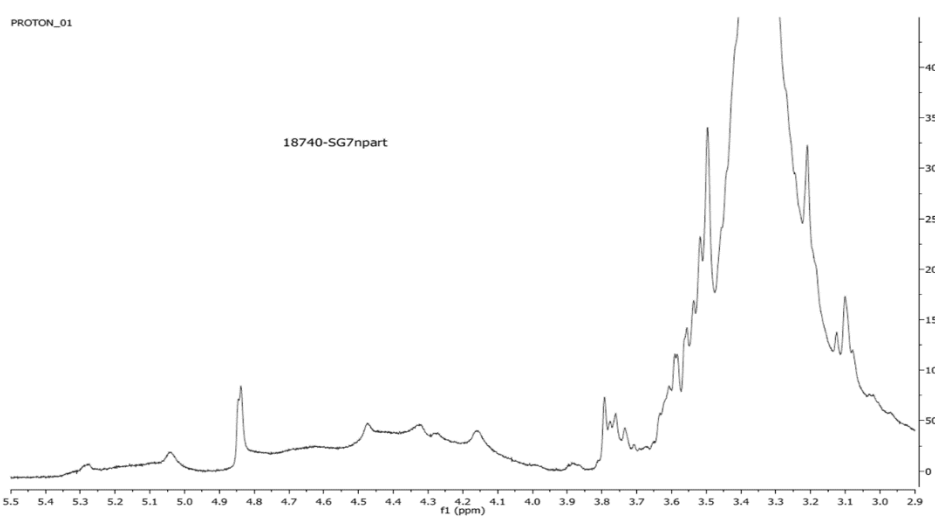
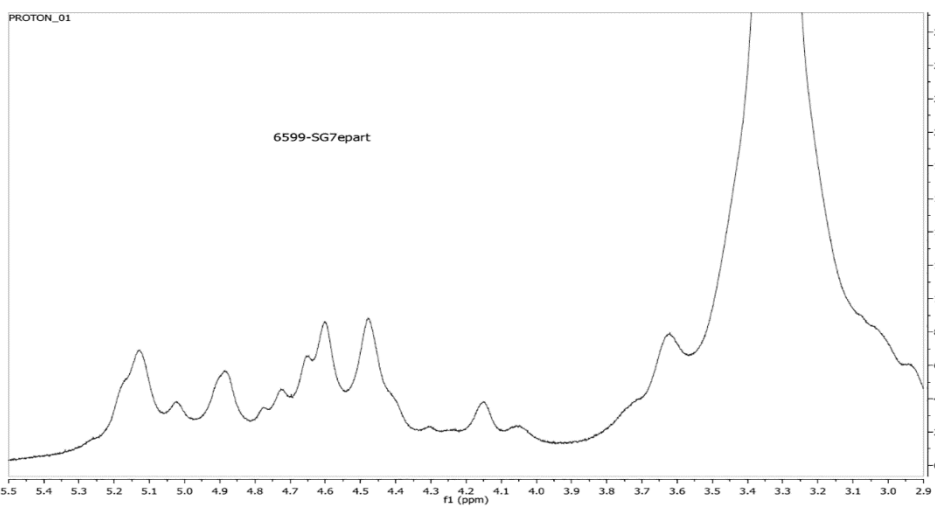
Табела 8.35. Резултати елементалне органске микроанализе код ИПСХ оба соја врсте *S. commune* Fr.

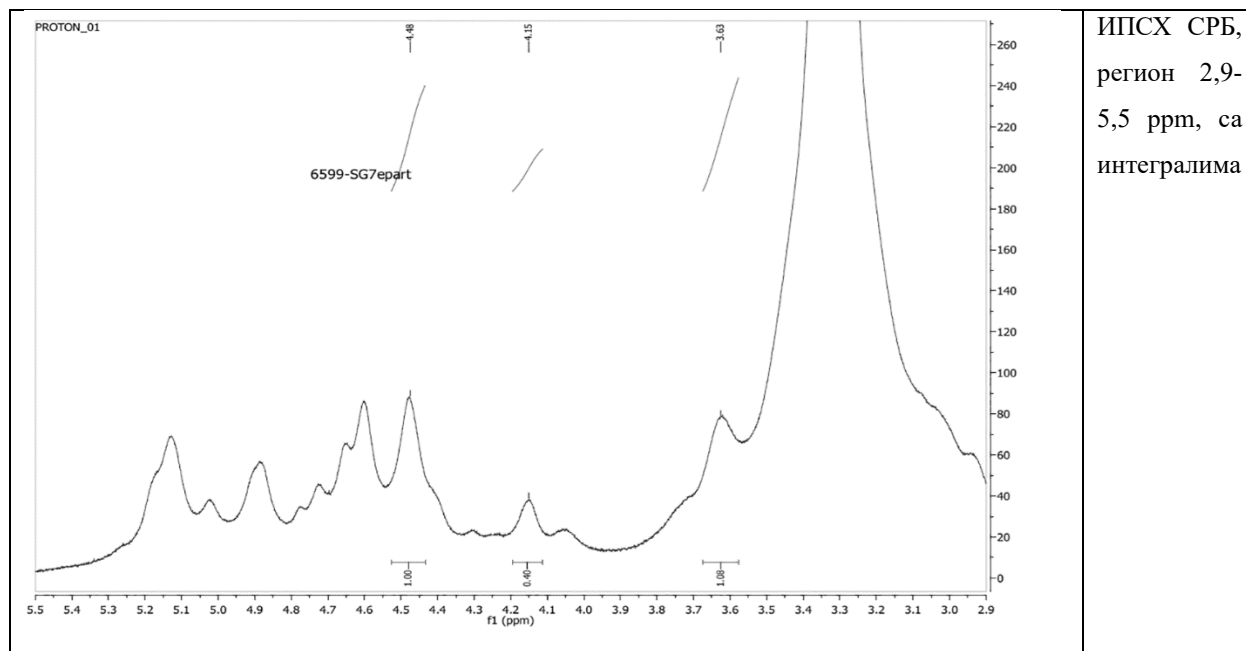
Садржај елемената (%)	ИПСХ СРБ	ИПСХ ИТА	ЕПСХ СРБ
N	3,15	2,75	3,16
C	38,40	37,53	37,16
S	/	/	/
H	6,74	6,46	6,69

8.5.9. NMR анализа

8.5.9.1. NMR спектри одабраних узорака

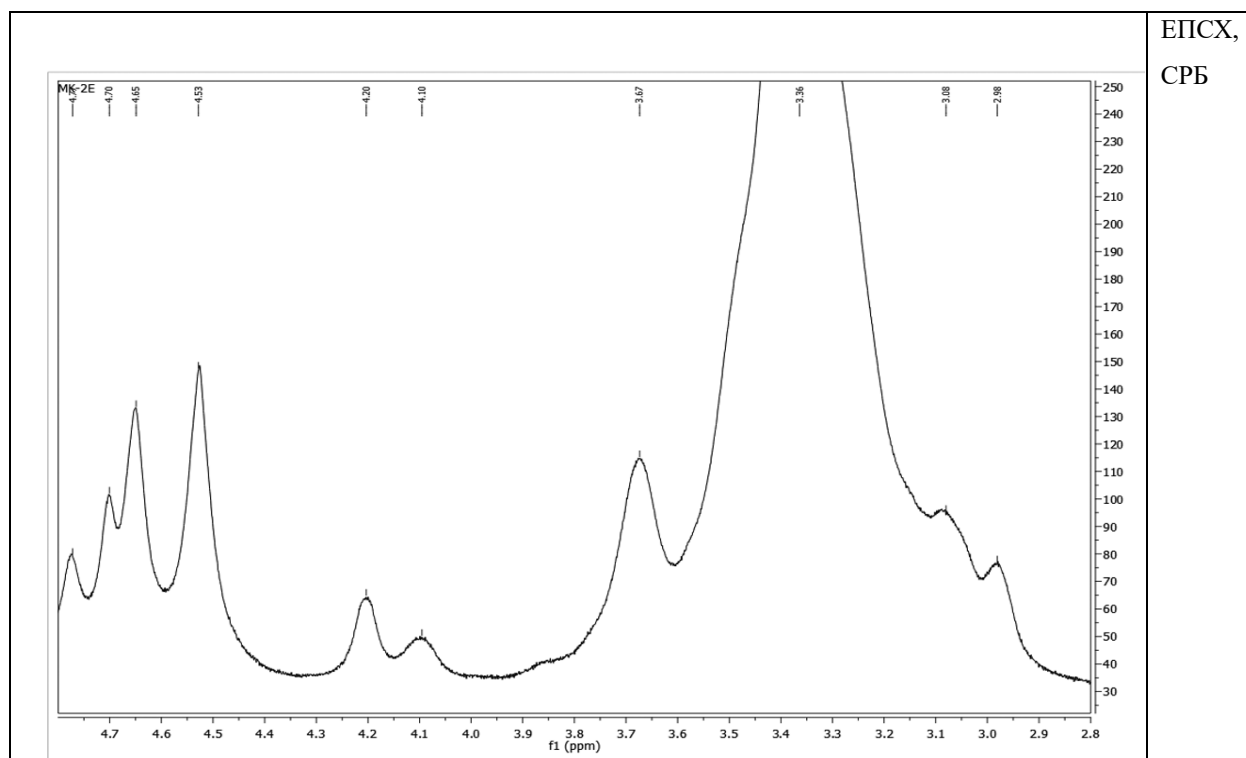


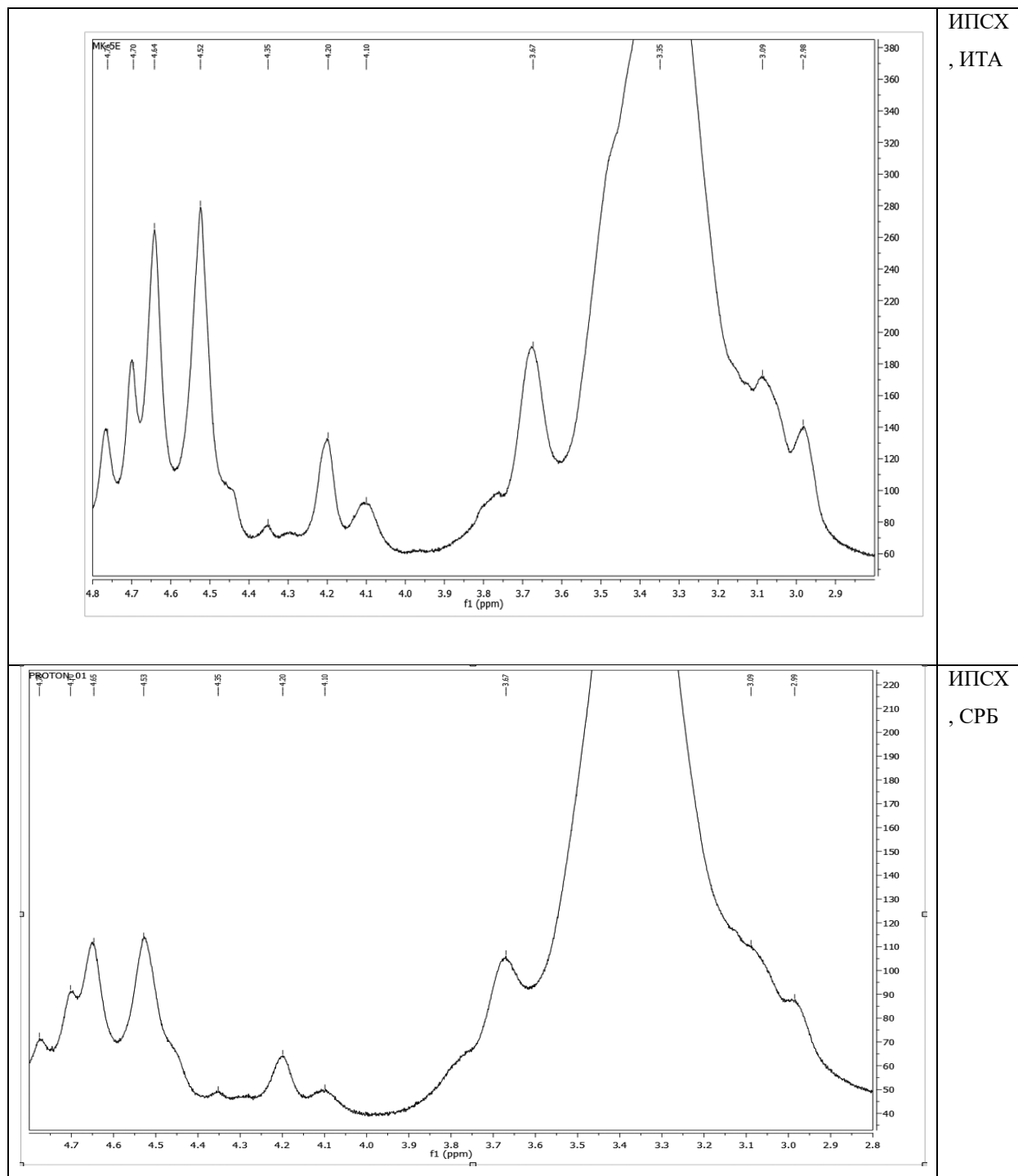
 <p>PROTON_01</p> <p>6599-SG7E</p> <p>The spectrum shows a complex multiplet between 4.0 and 5.5 ppm, a sharp singlet at approximately 3.4 ppm, and a smaller peak at approximately 1.2 ppm. The x-axis is labeled 'f1 (ppm)' and ranges from 10.0 to 0.0. The y-axis ranges from 0 to 320.</p>	ИПСХ, СРБ, ензимски третиран
 <p>PROTON_01</p> <p>18740-SG7npart</p> <p>The spectrum shows a broad multiplet between 3.0 and 5.5 ppm. The x-axis is labeled 'f1 (ppm)' and ranges from 5.5 to 2.9. The y-axis ranges from 0 to 400.</p>	ИПСХ, СРБ
 <p>PROTON_01</p> <p>6599-SG7epart</p> <p>The spectrum shows a complex multiplet between 3.0 and 5.5 ppm. The x-axis is labeled 'f1 (ppm)' and ranges from 5.5 to 2.9. The y-axis ranges from 0 to 260.</p>	ИПСХ, СРБ, регион 2,9- 5,5 ppm



Слика 8.4. NMR спектри ЕПСХ и ИПСХ узорака врсте *S. commune* Fr.

8.5.9.2. NMR спектри ензимски третираних узорака у региону 2,8-4,8 ppm





Слика 8.5. NMR спектри ензимски третираних ЕПСХ и ИПСХ узорака врсте *S. commune*

Fr.

8.6. Скрининг полисахаридних и етанолних екстраката гљиве за биопрајминг семена грашка

Табела 8.36. Предтест – биопрајминг семена грашка (*Pisum sativum* L.) са ЕТ екстрактима врсте *S. commune* Fr.

Узорак	ЕТ екстракт	Разблажење (%)	ЕК (%)	КЛ (%)	АТ (%)	ДНД5 (mm)	ДК5 (mm)	ДНД8 (mm)	ДК8 (mm)	СВН (g)	СВК (g)	СУН (g)	СУК (g)
1	7 дана БМ СРБ	0,5	56	72	0	4,3	20,8	13,7	46,8	0,3056	0,3848	0,0343	0,0376
2	7 дана БМ СРБ	0,1	76	76	4	5,2	21,0	16,8	38,4	0,3797	0,2829	0,0518	0,0331
3	7 дана Ф СРБ	0,5	88	88	0	4,6	28,2	17,6	56,2	0,2688	0,4759	0,041	0,0552
4	7 дана Ф СРБ	0,1	60	64	8	3,3	25,0	20,3	54,7	0,3306	0,1676	0,0407	0,0298
5	14 дана БМ СРБ	0,5	32	64	0	3,0	14,5	11,5	16,0	0,1239	0,0878	0,0463	0,0275
6	14 дана БМ СРБ	0,1	68	68	8	6,3	22,7	20,6	33,3	0,3259	0,1173	0,0434	0,0323
7	14 дана Ф СРБ	0,5	76	76	0	3,2	26,8	17,8	44,6	0,3516	0,3027	0,0441	0,0301
8	14 дана Ф СРБ	0,1	60	72	8	3,2	24,8	18,2	43,2	0,3331	0,2968	0,0449	0,0346
9	21 дан БМ СРБ	0,5	84	84	4	3,8	27,2	17,8	33,8	0,4019	0,3542	0,0502	0,0363
10	21 дан БМ СРБ	0,1	16	40	8	3,7	17,7	14,3	29,7	0,3000	0,2368	0,0437	0,0273
11	21 дан Ф СРБ	0,5	60	76	4	3,6	24,4	15,0	41,6	0,2998	0,3753	0,0416	0,0408
12	21 дан Ф СРБ	0,1	40	68	8	3,0	17,3	17,0	36,0	0,3969	0,2490	0,0494	0,0274
13	28 дана БМ СРБ	0,5	20	60	4	3,0	15,0	7,8	25,8	0,2138	0,1821	0,0283	0,0190
14	28 дана БМ СРБ	0,1	64	72	8	3,2	25,5	18,2	54,8	0,3935	0,3566	0,0444	0,0351
15	28 дана Ф СРБ	0,5	56	72	4	2,8	16,6	16,5	39,3	0,4591	0,2083	0,0530	0,0173
16	28 дана Ф СРБ	0,1	68	72	4	2,8	24,4	19,4	57,0	0,3879	0,3154	0,0489	0,0431
17	7 дана БМ ИТ	0,5	68	72	8	3,2	22,8	22,0	44,0	0,4714	0,3577	0,0559	0,0218
18	7 дана БМ ИТ	0,1	48	68	12	2,8	20,0	17,0	29,2	0,3477	0,2232	0,0426	0,0273
19	7 дана Ф ИТ	0,5	60	72	4	3,6	23,0	20,6	56,8	0,4503	0,3487	0,0541	0,0346
20	7 дана Ф ИТ	0,1	68	68	4	3,0	17,2	17,0	29,0	0,3740	0,3295	0,0535	0,0322
21	14 дана БМ ИТ	0,5	68	72	4	2,8	22,4	20,0	48,4	0,3811	0,3752	0,0448	0,0387
22	14 дана БМ ИТ	0,1	64	72	8	3,7	30,8	21,8	37,2	0,5363	0,4873	0,0580	0,0513
23	14 дана Ф ИТ	0,5	68	72	8	3,8	21,2	23,0	42,8	0,2637	0,3011	0,0380	0,0318
24	14 дана Ф ИТ	0,1	72	80	4	2,6	18,2	16,2	36,6	0,3907	0,3168	0,0498	0,0386
25	21 дан БМ ИТ	0,5	64	80	4	2,4	17,2	16,2	48,8	0,3175	0,3474	0,0362	0,0310

Јована Мишковић
Докторска дисертација

26	21 дан БМ ИТ	0,1	67	72	8	3,4	21,2	18,6	45,8	0,3774	0,344	0,0443	0,0325
27	21 дан Ф ИТ	0,5	76	80	4	4,3	27,7	26,8	55,8	0,5293	0,5334	0,0604	0,0505
28	21 дан Ф ИТ	0,1	68	72	4	1,4	19,0	14,2	42,8	0,2336	0,3010	0,0310	0,0320
29	28 дана БМ ИТ	0,5	76	76	4	2,6	22,0	18,8	54,6	0,4156	0,3790	0,0472	0,0312
30	28 дана БМ ИТ	0,1	64	72	4	3,6	20,2	21,0	48,8	0,4227	0,3450	0,0491	0,0319
31	28 дана Ф ИТ	0,5	60	68	8	2,4	19,2	19,8	44,4	0,4308	0,3959	0,0492	0,0368
32	28 дана Ф ИТ	0,1	76	76	8	3,6	23,0	24,2	55,0	0,4685	0,4193	0,0576	0,0388
33	Контрола	0	100	100	0	5,0	45,2	25,5	74,0	0,5162	0,7484	0,0647	0,0664
34	Хидропрајминг	0	96	96	4	13,2	82,6	35,8	83,4	0,7785	0,9711	0,0860	0,0830

ЕК- енергија клијања; КЛ- клијавост; АТ -атипични изданци; ДНД5 – дужина надземног дела пети дан; ДК5- дужина корена пети дан; ДНД8 - дужина надземног дела осми дан; ДК8- дужина корена осми дан; СВН – свежа маса надземног дела; СВК – свежа маса корена; СУН – сува маса надземног дела; СУК – сува маса корена.

Табела 8.37. Предтест – биопрајминг семена грашка (*Pisum sativum* L.) са ПСХ екстрактима врсте *S. commune* Fr.

ПСХ екстракт	ЕК (%)	КЛ (%)	АТ (%)	ДНД (mm)	ДК (mm)	СВН (g)	СВК (g)	СУН (g)	СУК (g)
14 дана БМ ИТ	5	96,67	0	66,0	187,0	2,113	2,000	0,1713	0,1398
21 дан БМ ИТ	5	95,33	0	68,0	177,0	1,748	2,050	0,1496	0,1295
14 дана Ф ИТ	5	95,33	0	74,0	187,0	1,969	1,943	0,1544	0,1224
21 дан Ф ИТ	5	94,00	0	67,0	191,0	1,673	1,796	0,1341	0,1189
14 дана БМ СРБ	4	91,67	1	70,0	172,5	1,638	1,464	0,1588	0,1310
14 дана Ф СРБ	5	93,33	0	62,5	179,0	1,755	2,204	0,1474	0,1551
21 дан БМ СРБ	5	93,67	0	63,0	163,0	1,740	1,932	0,1406	0,1263
21 дан Ф СРБ	5	93,00	0	68,0	190,0	1,780	2,118	0,1422	0,1193
Хидропрајминг	5	92,67	0	59,5	156,5	1,500	1,535	0,1160	0,0935
Контрола	4	91,67	0	54,5	141,0	1,148	1,250	0,0932	0,0958

ЕК- енергија клијања; КЛ- клијавост; АТ -атипични изданци; ДНД – дужина надземног дела пети дан; ДК- дужина корена пети дан; СВН – свежа маса надземног дела; СВК – свежа маса корена; СУН – сува маса надземног дела; СУК – сува маса корена.

8.7. Испитивање ензимске активности екстраката

Табела 8.38. Активност пирогалол пероксидазе (pPх) метанолних екстраката грашка *Pisum sativum* L. након биопрајминга полисахаридима гљиве *S. commune* Fr.

Третман	А ср	СД*	С ср протеини (mg/mL)	Активност pPх ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	Активност pPх ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-2}$)	Активност pPх ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-2}$)
Оптимални услови						
К	0,014	0,002	2,16	0,0004	0,0002	0,21
ХП	0,086	0,006	1,38	0,0028	0,0020	2,02
ЕПСХ ИТА	0,106	0,007	0,70	0,0034	0,0049	4,90
ИПСХ ИТА	0,115	0,010	1,63	0,0037	0,0023	2,28
ЕПСХ СРБ	1,60	0,419	1,46	0,0544	0,0373	37,28
ИПСХ СРБ	1,23	0,000	1,41	0,0403	0,0287	28,69
Суша						
К	0,131	0,009	1,43	0,0042	0,0030	2,97
ХП	0,110	0,007	1,76	0,0035	0,0020	2,02
ЕПСХ ИТА	0,089	0,008	0,81	0,0029	0,0035	3,56
ИПСХ ИТА	0,074	0,007	1,05	0,0024	0,0022	2,30
ЕПСХ СРБ	1,282	0,572	1,47	0,0415	0,0283	28,32
ИПСХ СРБ	1,213	0,197	1,63	0,0393	0,0241	24,10

*СД – стандардна девијација

Табела 8.39. Активност гвајакол пероксидазе (gPх) метанолних екстраката грашка *Pisum sativum* L. након биопрајминга полисахаридима гљиве *S. commune* Fr.

Третман	А ср	СД*	С ср протеини (mg/mL)	Активност gPх ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	Активност gPх ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-2}$)	Активност gPх ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-2}$)
Оптимални услови						
К	0,058	0,002	2,16	0,0002	0,0001	0,08
ХП	0,056	0,006	1,38	0,0002	0,0001	0,12
ЕПСХ ИТА	0,026	0,022	0,70	0,0002	0,0001	0,11
ИПСХ ИТА	0,040	0,006	1,63	0,0001	0,0001	0,07
ЕПСХ СРБ	0,244	0,013	1,46	0,0007	0,0005	0,50
ИПСХ СРБ	0,138	0,034	1,41	0,0004	0,0003	0,29
Суша						
К	0,060	0,007	1,43	0,0002	0,0001	0,13
ХП	0,038	0,001	1,76	0,0001	0,0001	0,07
ЕПСХ ИТА	0,138	0,005	0,81	0,0004	0,0005	0,51
ИПСХ ИТА	0,015	0,002	1,05	0,0001	0,0001	0,04
ЕПСХ СРБ	0,290	0,062	1,47	0,0009	0,0006	0,59
ИПСХ СРБ	0,177	0,030	1,63	0,0005	0,0003	0,33

*СД – стандардна девијација

Табела 8.40. Активност аскорбат пероксидазе (аРх) метанолних екстраката грашка *Pisum sativum* L. након биопрајминга полисахаридима гљиве *S. commune* Fr.

Третман	А ср	СД*	С ср протеини (mg/mL)	Активност аРх ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	Активност аРх ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-2}$)	Активност аРх ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-2}$)
Оптимални услови						
К	2,091	0,011	2,16	0,0249	0,0115	11,53
ХП	2,304	0,040	1,38	0,0274	0,0199	19,88
ЕПСХ ИТА	1,546	0,038	0,70	0,0184	0,0263	26,30
ИПСХ ИТА	1,820	0,031	1,63	0,0216	0,0133	13,29
ЕПСХ СРБ	1,175	0,016	1,46	0,0140	0,0096	9,58
ИПСХ СРБ	1,188	0,013	1,41	0,0141	0,0101	10,05
Суша						
К	2,152	0,052	1,43	0,0256	0,0179	17,92
ХП	1,801	0,030	1,76	0,0214	0,0122	12,18
ЕПСХ ИТА	1,752	0,022	0,81	0,0208	0,0257	25,75
ИПСХ ИТА	1,973	0,021	1,05	0,0235	0,0224	22,37
ЕПСХ СРБ	1,004	0,039	1,47	0,0119	0,0081	8,15
ИПСХ СРБ	1,314	0,094	1,63	0,0156	0,0096	9,60

*СД – стандардна девијација

Табела 8.41. Активност каталазе (САТ) метанолних екстраката грашка *Pisum sativum* L. након биопрајминга полисахаридима гљиве *S. commune* Fr.

Третман	А ср	СД*	С ср протеини (mg/mL)	Активност САТ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$)	Активност САТ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-2}$)	Активност САТ ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-2}$)
Оптимални услови						
К	0,949	0,014	2,16	0,0023	0,0013	1,32
ХП	0,649	0,032	1,38	0,0019	0,0014	1,41
ЕПСХ ИТА	0,822	0,011	0,70	0,0024	0,0035	3,52
ИПСХ ИТА	0,945	0,050	1,63	0,0028	0,0017	1,74
ЕПСХ СРБ	0,906	0,008	1,46	0,0027	0,0018	1,86
ИПСХ СРБ	1,239	0,090	1,41	0,0037	0,0026	2,64
Суша						
К	1,122	0,031	1,43	0,0034	0,0023	2,35
ХП	1,329	0,033	1,76	0,0039	0,0023	2,26
ЕПСХ ИТА	1,936	0,065	0,81	0,0058	0,0072	7,17
ИПСХ ИТА	1,539	0,021	1,05	0,0046	0,0043	4,40
ЕПСХ СРБ	1,516	0,002	1,47	0,0045	0,0031	3,09
ИПСХ СРБ	0,926	0,004	1,63	0,0028	0,0017	1,70

*СД – стандардна девијација

БИОГРАФИЈА



Јована Мишковић, рођ. Марић, рођена је 07.01.1994. године у Сомбору. Основну школу је завршила у родном Стапару као ђак генерације и носилац Вукове дипломе. Гимназију је завршила у Сомбору са одличним успехом и 2013. године је уписала биологију на Департману за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Новом Саду, смер професор биологије. Студије завршава у року са просеком 9.60, а 2017. године уписује мастер студије на истом факултету, упоредо два смера - мастер биолог (модул микробиолог) и мастер професор биологије. Мастер студије завршава 2018. године, и постаје мастер биолог (просек 9.83) и мастер професор биологије (просек 9.68). Након завршетка мастер студија, 2018. године уписује докторске студије на Природно-математичком факултету, смер доктор биолошких наука. Године 2019. добија звање истраживач приправник и запошљава се на ПМФ-у у оквиру програма Министарства науке, технолошког развоја и иновација, а 2022. стиче звање истраживач сарадник. Током 2020. и 2021. године била је ангажована у оквиру пројекта Доказ концепта Фонда за иновациону делатност, под руководством своје менторке, проф. др Маје Караман, као и EU4Tech PoC пројекта. Поред тога, 2021. године била је део ЕИТ Jumpstarter пројекта, и ангажована као истраживач на пројекту Покрајинског секретаријата за високо образовање и научноистраживачку делатност Војводине. Од 1. децембра 2022. године ангажована је као истраживач на пројекту Трансфера технологије Фонда за иновациону делатност. Своја истраживања и рад базира у оквиру више области: микробиологије, микологије, биохемије и пољопривреде. Досадашњи научни рад публиковала је у више научних часописа са SCI листе, као први аутор (3) и као коаутор (5), као и у саопштењима на међународним и домаћим скуповима (9). Течно говори енглески језик (C1 ниво) и поседује изузетне дигиталне компетенције и познавање разних софтвера за обраду, анализу и презентацију научних података. Усавршила је статистичку обраду података похађањем курса у оквиру летње школе у Најмегену у Холандији јула 2019. године. Такође, у оквиру докторских студија активно се бави писањем пројеката. Била је и ментор средњошколцу Ђорђу Тинтору, који је на такмичењу научних радова за средње школе освојио треће место. Јована је била активни члан АIESEC-а и волонтер на Ноћи биологије на ПМФ-у, а члан је и Удружења микробиолога Србије. Удата је и има сина.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
„Биолошки потенцијал врсте <i>Schizophyllum commune</i> Fries 1815. из потопљене културе у биопрајмингу семена грашка (<i>Pisum sativum</i> L.)“
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду б) Институт за ратарство и повртарство, Нови Сад
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Програм научноистраживачког рада Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије Докторске академске студије, Доктор наука - биолошке науке
1. Опис података
1.1 Врста студије У оквиру студије одрађене су <i>in vitro</i> анализе антиоксидативне, антимикробне, антиацетилхолинестеразне активности различитих екстраката гљиве <i>S. commune</i> . Додатно, истраживање је обухватило и детаљну биохемијску карактеризацију екстраката гљиве, екстраката грашка као и полисахарида изолованих из гљиве. Урађена је и <i>in silico</i> студија ради провере идентификације сојева гљиве <i>S. commune</i> . Применом стандардног теста клијавости (ISTA, 2022) испитан је утицај биопрајминга полисахаридима гљиве на грашак. Поред тога испитана је ензимска и неензимска антиоксидативна активност екстраката грашка након биопрајминга, применом различитих <i>in vitro</i> спектрофотометријских есеја.
1.2 Врсте података а) квантитативни б) квалитативни
1.3. Начин прикупљања података а) генотипови: навести врсту: <i>S. commune</i> Fr., 0043 и 0047 (колекција култура ProFungi лабораторија) и грашак <i>P. sativum</i> L. б) апсорбанце спектрофотометријских мерења в) ручно мерење параметара квалитета семена и почетног пораста биљака
1.3 Формат података, употребљене скале, количина података 1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

a) Excel фајл, датотека .xlsx

b) SPSS фајл, датотека .sav, .spv

c) PDF фајл, датотека ___

d) Текст фајл, датотека .doc

e) JPG фајл, датотека .jpg

f) Остало, датотека .orj

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

a) број варијабли: 42

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): Свака *in vitro* анализа је рађена у 3 понављања. За хемијску карактеризацију екстраката анализиран је од 0.5 до 1 g сваког испитаног узорка, у зависности од методе.

1.3.3. Поновљена мерења

a) да

б) не

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

a) *Да*

б) *Не*

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

a) експеримент, навести тип – *in vitro* спектрофотометријска анализа антиоксидативних, антимикуробних и антиацетилхолинестеразних карактеристика различитих екстраката. Хемијска карактеризација екстраката одрађена је применом више различитих *in vitro* метода, као и применом FTIR, LC-MS/MS и NMR техника, док је скенинг електронска микроскопија пружила детаљнију слику. Урађена је и *in silico* претрага секвенци сојева гљиве *S. commune* Fr. и филогенетска анализе у MEGA X програму. Тестирање квалитета семена и почетног пораста грашка је изведено у применом стандардног теста клијавости.

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, навести тип _____

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

FTIR спектрофотометар (Thermo-Nicolet Model 6700, Thermo Scientific, САД), спектрофотометар (Multiskan GO Thermo Scientific, Финска), скенирајући електронски микроскоп (JEOL JSM 6460 LV, Токио, Јапан), спектрометар за NMR анализу (400 MHz - Varian / Agilent) и течни хроматограф (Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution), програмски пакети за *in silico* анализу.

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Не

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Контрола добијених података је извршена коришћењем контролних експеримената и детаљним статистичким анализама у следећим софтверима: IBM SPSS статистички софтвер (верзија 22.0 за Windows), Statistica софтвер (верзија 12.01.), Microsoft Excel програм (верзија 2016) и Past4Project софтвер (верзија 1.0.0.0.).

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Није било уноса података у матрицу.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани. Подаци из прилога ће бити јавно доступни на сајту Нардус-а.

3.1.2. URL адреса <https://nardus.mpn.gov.rs/handle/123456789/42>

3.1.3. DOI није додељен

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу? Да

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити употребљен? Описани

3.2.2. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Дисертација – Јована Мишковић, Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? Неограничено

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не
3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена? Да Не
4. Безбедност података и заштита поверљивих информација
4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Не
4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Не
5. Доступност података
5.1. <i>Подаци ће бити јавно доступни</i>
5.4. <i>Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.</i> <i>Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима</i>
6. Улоге и одговорност
6.1. <i>Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података</i> Јована Мишковић, jovana.maric@dbe.uns.ac.rs
6.2. <i>Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима</i> Јована Мишковић, jovana.maric@dbe.uns.ac.rs
6.3. <i>Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима</i> Јована Мишковић, jovana.maric@dbe.uns.ac.rs