

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Marija V. Ćosić

EFEKAT APSCISINSKE KISELINE U  
ODGOVORU ODABRANIH VRSTA BRIOFITA NA  
STRES IZAZVAN NATRIJUM-HLORIDOM

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Marija V. Ćosić

THE EFFECT OF ABSCISIC ACID IN THE  
RESPONSE OF SELECTED BRYOPHYTE  
SPECIES UPON SODIUM CHLORIDE STRESS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

## Komisija za odbranu doktorske disertacije

**Mentori:** \_\_\_\_\_

Prof. dr Marko Sabovljević, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

\_\_\_\_\_  
Doc. dr Milorad Vujičić, docent,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

**Članovi komisije:** \_\_\_\_\_

Prof. dr Miloš Mojović, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju

\_\_\_\_\_  
Prof. dr Aneta Sabovljević, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

\_\_\_\_\_  
Prof. dr Dušica Janošević, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

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

## Izjave zahvalnosti

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Institutu za Botaniku i botanička bašta „Jevremovac“, dok su određene analize odrađene na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u okviru projekta osnovnih istraživanja OI173024, Fakultetu za fizičku hemiju i Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojim mentorima prof. dr Marku Sabovljeviću i doc. dr Miloradu Vujičiću, koji su me upoznali sa fiziologijom briofita i vodili kroz ceo proces izrade i pisanja doktorske disertacije uz dosta podrške i pomoći u svakom segmentu eksperimentalnog rada. Ne mogu vam se dovoljno zahvaliti na vašem angažovanju, poverenju, pomoći, savetima i vremenu koje ste mi posvetili. Posebno se zahvaljujem prof. dr Aneti Sabovljević na prenesenom znanju, ohrabrenju i dragocnim savetima tokom izrade doktorske disertacije. Privilegija je saradivati sa ovim divnim ljudima i učiti od njih.

Veliko hvala prof. dr Milošu Mojoviću na saradnji i tumačenju rezultata iz oblasti koja je meni bila nepoznata. Svojim savetima doprineo je lakšem savladavanju nove tehnike i osmišljavanju novih ideja za dalji eksperimentalni rad. Takođe se zahvaljujem dr Đuri Nakaradi, koji mi je nesebično pomagao sve vreme koje sam provodila u laboratoriji na Fakultetu za fizičku hemiju.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr Dušici Janošević na pomoći i prenesenom znanju iz oblasti histohemijskih analiza, koje su doprinele kvalitetu ove doktorske disertacije. Takođe joj se zahvaljujem na vrednim savetima i kvalitetnom vremenu provedenom u laboratoriji i van nje.

Dr Tomislavu Tostiju sa Hemijskog fakulteta se iskreno zahvaljujem na pomoći i trudu uloženom za analiziranje šećera i otvaranju novih mogućnosti za buduću saradnju.

Veliko hvala dr Danijeli Mišić koja me je zaposlila na projekat i omogućila da započnem svoje istraživanje u okviru njega, kao i na pomoći i savetima koji su bili ključni za analizu fenolnih jedinjenja u ovoj disertaciji. Iskreno se zahvaljujem svim kolegama sa projekta, koji su se uvek trudili da mi pomognu tokom mog boravka na Odeljenju za fiziologiju biljaka na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ i koji su uvek bili pozitivni i puni podrške.

Mojoj dragoj kolegici Mariani Oalđe se najiskrenije zahvaljujem na vremenu i trudu, ali i znanju koje je nesebično sa mnom podelila, na vrednim savetima, pomoći i pozitivnoj energiji prilikom rada u laboratoriji, a posebno tokom pisanja disertacije. Razgovori sa njom su uvek vodili ka inspiraciji i boljem raspoloženju.

Puno hvala svim profesorima i kolegama sa Katedre za fiziologiju biljaka za konstruktivne savete i pomoć kada god je to bilo potrebno, na kvalitetnim razgovorima i poverenju.

Zahvaljujem se kolegama članovima grupe za biologiju briofita, a posebno kolegicama dr Jovani Pantović i Jeleni Stanković, na sadržajnim razgovorima, razmeni ideja, diskusiji o problematici tokom izrade disertacije, a najviše na razumevanju i druženju.

Veliko hvala svim meni dragim kolegama sa Instituta za botaniku za usputne savete, pozitivnu energiju i šale, kojima su značajno doprineli mojoj istrajnosti i dali mi vetar u leđa.

Posebno se zahvaljujem prijateljici i kolegici Maji Belić, mom saborcu od prve godine osnovnih studija, pa sve do završetka doktorata na pomoći, savetima, druženju i dosta podrške i razumevanja. Uvek je lakše kada imate nekoga sa kim možete podeliti sve izazove koje nameću doktorske studije.



Sa podjednakom značajnošću, zahvaljujem se svojim dugogodišnjim prijateljicama Jelisaveti, Jeleni S., Jeleni J., Mini i Sanji, koje su se uvek interesovale za moj rad, bodrile me i verovala u mene, čak i kada ja to nisam. Beskrajno se zahvaljujem Siniši na strpljenju i pozitivnoj energiji tokom svih godina. Ova disertacija je i njegov uspeh.

Nemam reči kojima bih se zahvalila svojoj porodici, posebno svojim roditeljima Vidosavu i Gordani i sestri Tijani, jer sve što su učinili za mene se čini tako beznačajnim kada se napiše. Stoga, njima posvećujem ovaj rad, kao nagradu za svu ljubav i podršku kojom su mi omogućili da istrajem do kraja.

# Efekat apscisinske kiseline u odgovoru odabranih vrsta briofita na stres izazvan natrijum-hloridom

## Sažetak

Poznato je da briofite odgovaraju na povećane koncentracije NaCl i ABA na fiziološkom, biohemijskom i molekularnom nivou, iako je većina istraživanja bazirana na model vrsti *Physcomitrella patens*. U cilju ispitivanja efekata NaCl i ABA na halofitne vrste mahovina (*Entosthodon hungaricus* i *Hennediella heimii*) i definisanje razlika u odgovoru i otpornosti među njima, korišćene su različite biohemijske i histohemijske metode kojima su identifikovana i kvantifikovana jedinjenja, čije prisustvo može ukazati na njihovu ulogu u toleranciji na stres izazvan NaCl. ABA utiče na smanjenje koncentracije fotosintetičkih pigmenata, fenolnih jedinjenja, terpenoida i šećera. Međutim, kada se primeni kao predtretman, dovodi do povećanja preživljavanja održavajući koncentraciju primarnih i sekundarnih metabolita na umerenom nivou. Kvalitativni i kvantitativni sastav pojedinačnih komponenti je *species*-specifičan, što uslovljava različit odgovor na egzogeno dodat NaCl i ABA. *Entosthodon hungaricus* dominantno akumulira p-kumarinsku kiselinu i flavonoide, slično vrsti *P. patens*, dok *H. heimii* poseduje najveću koncentraciju terpenoida i flavonoida, ali ne i p-kumarinsku kiselinu. Šećeri su bitna komponenta kod sve tri vrste, mada se izomaltoza specifično nalazi kod brio-halofita tokom delovanja NaCl. Histohemijskim tehnikama je potvrđena akumulacija metabolita u protonemi, dok visoke koncentracije NaCl utiču na njihovu akumulaciju i u filoidima. ABA utiče na transpoziciju fenolnih jedinjenja u ćelijske zidove protoneme i filoida. Brio-halofite akumuliraju metabolite u većoj koncentraciji i odlikuje ih smanjena produkcija slobodnih radikala, što ukazuje da su one u velikoj meri prethodno pripremljene na stres izazvan sa NaCl i da ABA dodatno utiče na poboljšanje njihovog odgovora.

**Ključne reči:** NaCl, ABA, mahovine, *Physcomitrella patens*, *Entosthodon hungaricus*, *Hennediella heimii*

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija biljaka

**UDK broj:** 582.32:581.526.52:661.833'032.1(043.3)

# The effect of abscisic acid in the response of selected bryophyte species upon sodium chloride stress

## Abstract

Bryophytes are known to respond to elevated NaCl concentrations and exogenous ABA at physiological, biochemical, and molecular levels, although most studies are based on model moss *Physcomitrella patens*. The aim of this research is to investigate the effects of NaCl and ABA on bryo-halophytes (*Entosthodon hungaricus* i *Hennediella heimii*) and to define the differences in their responses and resistance to salt stress using biochemical and histochemical analyses to identify and quantify compounds involved in tolerance to salt stress. Exogenous ABA leads to a decrease in the concentration of photosynthetic pigments, phenolic compounds, terpenoids, and sugars. When ABA was applied prior to salt stress, not only the survival rate, but also the concentration of primary and secondary metabolites increased. The qualitative and quantitative contents of metabolites are *species-specific*, indicating different responses to exogenous NaCl and ABA. *Entosthodon hungaricus* accumulates p-coumaric acid and flavonoids, similarly to *P. patens*, while terpenoids and flavonoids are dominantly present in *H. heimii*, but not p-coumaric acid. Sugars are important constituents in all three studied species, although isomaltose may be a specific sugar in bryo-halophytes during salt stress. Histochemical analyses revealed an accumulation of metabolites in the protonema, while they can also be detected in phylloids upon elevated NaCl concentration. Exogenous ABA affects the conversion of phenolic compounds into cell walls of protonema and phylloids. Bryo-halophytes accumulate metabolites in greater concentration and produce smaller amount of free oxygen radicals, suggesting that they are to some extent prepared for salt stress, and that ABA pretreatment increases their response to stress.

**Key words:** NaCl, ABA, mosses, *Physcomitrella patens*, *Entosthodon hungaricus*, *Hennediella heimii*

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Plant physiology

**UDK number:** 582.32:581.526.52:661.833'032.1(043.3)

## Lista skraćenica

AAE	Ekvivalent askorbinske kiseline
ABA	Apscisinska kiselina
ABC	Transporteri (eng. ATP-Binding Cassete)
ABI1	Transkripcioni faktor (eng. Abscisic acid insensitive 1)
ABI2	Transkripcioni faktor (eng. Abscisic acid insensitive 2)
ABI3	Transkripcioni faktor (eng. Abscisic acid insensitive 3)
ABRE	Elementi promotora (eng. ABA-Responsive Elements)
ANOVA	Analiza varijanse
Ap	Apigenin
AP2/EREBP	Transkripcioni faktor (eng. Apetala2/Ethylene responsive element binding proteins)
APX	Askorbat peroksidaza
AREB/ABF	Transkripcioni faktor (eng. ABRE-binding protein/ABRE-binding factor)
Asc <sup>•-</sup>	Askorbil radikal
ATP	Adenozin trifosfat
BHA	Butilisani hidroksianizol
BHT	Butilisani hidroksitoluen
bZIP	Transkripcioni faktor (eng. Basic leucine zipper)
CA	Kafena kiselina
CAE	Ekvivalent kafene kiseline
CAM	Tip metabolizma fotosinteze (eng. Crassulacean Acid Metabolism)
CAT	Katalaza
CDPK	Kalcijum zavisna protein kinaza
CE	Ekvivalent kumarina
CE1	Kuplujući elementi promotora 1 (eng. Coupling element 1)
CE3	Kuplujući elementi promotora 2 (eng. Coupling element 3)
cGMP	Ciklični guanozin monofosfat
COR	Proteini hladnog stresa (eng. Cold-regulated)
DHAR	Dehidroaskorbat reduktaza
DHNA	Dehidrin A
DHNB	Dehidrin B
DEPMPO	5-dietoksifosforil-5-metil-1-pirolin-N-oksid
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DPX	1-deoksi-D-ksilulozo-5-fosfat
DRE/CRT	Transkripcioni faktor (eng. Dehydration Responsive Elements/C-repeat)
DREB	Transkripcioni faktor (eng. Dehydration responsive element binding)
EPR	Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija
FeCl <sub>3</sub>	Gvožđe-hlorid
FPP	Farnezil-pirofosfat
GAE	Ekvivalent galne kiseline
GB	Glicin betain
GGPP	Geranilgeranil-pirofosfat
GPX	Glutation peroksidaza
GR	Glutation reduktaza
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Vodonik peroksid
HESI	Elektron sprej jonizacija (eng. heated electrospray ionization)
HPLC-PAD	Tečna hromatografija pod visokim pritiskom sa fotodiodnim detektorom (eng. Ultra High Performance Liquid Chromatography/Photodiode Array Detector)

HS proteini	Proteini toplotnog stresa (eng. Heat Shock)
IM	Indeks multiplikacije
Io	Izoorijentin
IPP	Izopentenil-pirofosfat
Iq	Izokvercitrin
Ir	Izoramnetin
Ka	Kamferol
LD	Lipidne kapljice (eng. Lipid droplets)
LE	Ekvivalent linaloola
LEA	LEA proteini (eng. Late Embryogenesis Abundant)
LSD	Test najmanje značajnosti (eng. Least significance test)
Lu	Luteolin
MAPK	Mitogenom aktivirana protein kinaza
MDHAR	Monodehidroaskorbat-reduktaza
MCamb1	Kalmodulin vezujući protein 1 (eng. Membrane Calmoduline binding 1)
MCamb2	Kalmodulin vezujući protein 2 (eng. Membrane Calmoduline binding 2)
MS	Masena spektroskopija
Na	Naringenin
NaCl	Natrijum-hlorid
NaOH	Natrijum-hidroksid
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Natrijum metabisulfat
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NCED	9- <i>cis</i> -epoksikarotenoid dioksigenaza
NO	Azot-monoksid
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Superoksid anjon radikal
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singlet kiseonik
·OH	Hidroksil radikal
PAS	Reakcija perjodne kiseline i Šiff reagensa (eng. Periodic Acid – Schiff reakcija)
p-CA	p-kumarinska kiselina
<i>PCA1</i>	Gen za PII tip Ca <sup>2+</sup> -ATPazu (eng. <i>Physcomitrella</i> Ca <sup>2+</sup> -ATPase)
PLD	Fosfolipaza D
POX	Peroksidaza
PP2C	Protein fosfataza 2C
PpABI3	Transkripcioni faktor (eng. <i>Physcomitrella patens</i> Abscisic acid insensitive 3)
PpDBF1	Transkripcioni faktor (eng. <i>Physcomitrella patens</i> Dehydration Binding Factor 1)
<i>PpDHNA</i>	Gen za dehidrin A (eng. <i>Physcomitrella patens</i> Dehydrine A)
<i>PpDHNB</i>	Gen za dehidrin B (eng. <i>Physcomitrella patens</i> Dehydrine B)
<i>PpDHNC</i>	Gen za dehidrin C (eng. <i>Physcomitrella patens</i> Dehydrine C)
<i>PpDHND</i>	Gen za dehidrin D (eng. <i>Physcomitrella patens</i> Dehydrine D)
<i>PpENAI</i>	Gen za transportere za natrijum (eng. <i>Physcomitrella patens</i> Exitus Natru 1)
<i>PpENA2</i>	Gen za transportere za natrijum (eng. <i>Physcomitrella patens</i> Exitus Natru 2)
PpSHP1	Vakuolarna H <sup>+</sup> -ATP-aza 1 (eng. <i>Physcomitrella patens</i> Small hydrophobic protein 1)
PpSHP2	Vakuolarna H <sup>+</sup> -ATP-aza 2 (eng. <i>Physcomitrella patens</i> Small hydrophobic protein 2)
Pro	Prolin
PYL	Pirolizin
PYR	Pirabaktin
RCAR	Pirabaktin rezistentna komponenta ABA receptora
<i>RCI</i>	Gen za vakuolarnu H <sup>+</sup> -ATP-azu 1 kod <i>Arabidopsis thaliana</i> (eng. Rare Cold Inducible)
RNS	Reaktivni oblici azota

ROS	Reaktivni oblici kiseonika
Ru	Rutin
SA	Salicilna kiselina
ScABI3	Transkripcioni faktor (eng. <i>Syntrichia caninervis</i> Abscisic acid insensitive 3)
sHSP	Mali proteini toplotnog stresa (eng. small Heat shock proteins)
SnRK2	Protein kinaza (eng. Sucrose non-fermenting kinase 2)
SOD	Superoksid dismutaza
SOS1	Membranski Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter (eng. Salt Overly Sensitive 1)
SOS 2	Serin/treonin kinaza (eng. Salt Overly Sensitive 2)
SOS 3	Kalcijum vezujući protein (eng. Salt Overly Sensitive 3)
SOS 4	Pirodoksal kinaza (eng. Salt Overly Sensitive 4)
SOS 5	Adhezivni protein (eng. Salt Overly Sensitive 5)
QE	Ekvivalent kvercetina
Qe	Kvercitrin
TAP	Proteini asocirani sa transkripcijom (eng. Transcription-associated protein)
TF	Transkripcioni faktor
UAE	Ekvivalent ursolne kiseline
UHPLC	Tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom (eng. Ultra High Performance Liquid Chromatography)
UV	Ultraljubičasti deo spektra
Va	Vanilin

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Opšte karakteristike briofita .....	1
1.2. Evolucija i filogenija briofita .....	2
1.3. Rasprostranjenje i diverzitet briofita .....	3
1.4. Životni ciklus briofita.....	4
1.4.1. Vegetativno razmnožavanje briofita.....	7
1.5. Morfo-anatomske karakteristike briofita.....	9
1.5.1. Karakteristike rožnjača (Anthocerotophyta).....	9
1.5.2. Karakteristike jetrenjača (Marchantiophyta) .....	10
1.5.3. Karakteristike mahovina (Bryophyta) .....	11
1.6. Značaj briofita .....	12
1.7. Fiziologija stresa kod biljaka.....	15
1.7.1. Stres izazvan natrijum-hloridom.....	16
1.7.2. Efekti stresa izazvanog solima na biljke.....	17
1.7.3. Odgovor biljaka na stres izazvan solima i mehanizmi odbrane od stresa izazvanog solima .....	19
3.1.2.1. Održavanje jonske i osmotske homeostaze.....	23
3.1.2.2. Sinteza kompatibilnih rastvora.....	24
3.1.2.3. Sinteza zaštitnih proteina .....	26
3.1.2.4. Zaštita od oksidativnog stresa .....	27
3.1.3. Signalni put stresa izazvanog solima.....	29
1.8. Neenzimske komponente briofita u odgovoru na oksidativni stres i sekundarni metaboliti briofita .....	30
1.9. Uloga apscisinske kiseline u stresu izazvanom solima .....	32
1.9.1. Biosinteza apscisinske kiseline.....	32
1.9.2. Receptorski kompleks apscisinske kiseline .....	33
1.9.3. Uloga apscisinske kiseline u morfološkim promenama kod briofita.....	34
1.9.4. Uloga apscisinske kiseline u toleranciji stresa kod briofita.....	35
1.10. Biologija ispitivanih vrsta .....	37
1.10.1. <i>Physcomitrella patens</i> (Hedw.) Bruch & Schimp .....	37
1.10.2. <i>Entosthodon hungaricus</i> (Boros) Loeske .....	39
1.10.3. <i>Henediella heimii</i> (Hedw.) R. H. Zander.....	40

<b>2. CILJEVI RADA</b> .....	<b>43</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>44</b>
3.1. Dizajn eksperimenta .....	44
3.2. Sterilizacija posuđa, instrumenata i hranljivih podloga .....	45
3.3. Sastav hranljivih podloga .....	45
3.4. Analiza morfo-genetskih parametara.....	47
3.5. Spektrofotometrijska analiza fotosintetičkih pigmenata .....	47
3.6. Analiza fenolnih jedinjenja i terpenoida .....	48
3.6.1. Određivanje količine ukupnih fenola Folin – Ciocalteu metodom.....	48
3.6.2. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina.....	48
3.6.3. Određivanje ukupnih flavonoida .....	49
3.6.4. Određivanje ukupnih flavonola .....	49
3.6.5. Određivanje ukupnih kumarina .....	49
3.6.6. Određivanje fenolnih jedinjenja UHPLC/ DAD/ (±) HESI - MS2 analiza sadržaja fenolnih jedinjenja.....	50
3.6.7. Određivanje ukupnih terpenoida.....	51
3.6.8. Određivanje ukupnih triterpenoida .....	51
3.7. Određivanje antioksidativnog kapaciteta biljaka .....	51
3.7.1. Određivanje antioksidativnog kapaciteta biljaka DPPH testom.....	51
3.7.2. Određivanje redukcionog potencijala .....	52
3.7.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti β-karoten/linolna kiselina testom.....	52
3.8. Analiza sadržaja šećera i šećernih alkohola HPLC - PAD metodom.....	52
3.9. Detekcija reaktivnih oblika kiseonika .....	53
3.10. Histo-hemijska analiza odabranih grupa jedinjenja.....	54
3.10.1. Određivanje fenolnih jedinjenja UV – autofluorescencijom .....	54
3.10.2. Određivanje fenolnih jedinjenja reakcijom sa FeCl <sub>3</sub> .....	54
3.10.3. Određivanje terpena reakcijom sa NADI reagensom.....	55
3.10.4. Određivanje lipida reakcijom sa Sudan Black B bojom .....	55
3.10.5. Određivanje polisaharida PAS reakcijom .....	55
3.11. Statistička obrada podataka .....	56
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>57</b>
4.1. Analiza morfo-genetskih parametara.....	57
4.2. Spektrofotometrijska analiza fotosintetičkih pigmenata .....	65



4.3. Analiza fenolnih jedinjenja i terpenoida .....	71
4.3.1. Određivanje količine ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom .....	71
4.3.2. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina.....	73
4.3.3. Određivanje ukupnih flavonoida .....	75
4.3.4. Određivanje ukupnih flavonola .....	77
4.3.5. Određivanje ukupnih kumarina .....	79
4.3.6. Određivanje fenolnih jedinjenja UHPLC/ DAD/ ( $\pm$ ) HESI - MS2 analizom.....	81
4.3.7. Određivanje ukupnih terpenoida.....	87
4.3.8. Određivanje ukupnih triterpenoida .....	89
4.4. Određivanje antioksidativnog kapaciteta biljaka .....	91
4.4.1. Određivanje antioksidativnog kapaciteta biljaka DPPH testom.....	91
4.4.2. Određivanje redukcionog potencijala .....	93
4.4.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti $\beta$ -karoten/linolna kiselina testom .....	95
4.5. Analiza sadržaja šećera i šećernih alkohola HPLC - PAD metodom.....	96
4.6. Detekcija reaktivnih oblika kiseonika .....	105
4.7. Histoheмиjska analiza odabranih grupa jedinjenja.....	112
4.7.1. Određivanje fenolnih jedinjenja UV – autofluorescencijom .....	112
4.7.2. Određivanje fenolnih jedinjenja reakcijom sa FeCl <sub>3</sub> .....	116
4.7.3. Određivanje terpena reakcijom sa NADI reagensom.....	121
4.7.4. Određivanje lipida reakcijom sa Sudan Black B bojom .....	125
4.7.5. Određivanje polisaharida PAS reakcijom .....	130
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>135</b>
5.1. Analiza morfofenetskih parametara.....	135
5.2. Spektrofotometrijska analiza fotosintetičkih pigmenata .....	137
5.3. Analiza fenolnih jedinjenja i terpenoida .....	140
5.3.1. Fenolna jedinjenja.....	140
5.3.2. Terpeni i lipidi .....	145
5.4. Određivanje antioksidativnog kapaciteta biljaka .....	149
5.5. Analiza sadržaja šećera .....	151
5.6. Detekcija reaktivnih oblika kiseonika .....	154
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>158</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>159</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Opšte karakteristike briofita

Briofite su parafiletska grupa viših biljaka koja tradicionalno obuhvata tri klase: rožnjače (Anthocerotopsida), jetrenjače (Marchantiopsida) i prave mahovine (Bryopsida). Danas opšte prihvaćena klasifikacija svrstava briofite u posebno podcarstvo – Bryobiotina, koje se deli u tri razdela: Anthocerotophyta, Marchantiophyta i Bryophyta. Pored ove klasifikacije u literaturi se mogu sresti i podele na više razdela u okviru Bryobiotina i to na: talusne jetrenjače (Marchantiophyta), iz kojih su izdvojene listaste jetrenjače (Jungermanniophyta), zatim bele mahovine ili tresetnice (Sphagnophyta), fenjerače (Andreophyta), vlasci (Polytrichophyta) i odvojene od drugih mahovina, najbrojnije vrstama, prave, listaste ili jednostavno mahovine (Bryophyta), te rožnjače ili rogljaste mahovine (Anthocerotophyta), kao i još neke manje grupe koje se mogu izdvojiti kao posebne grane filogenetskog stabla (Glime 2007). Međutim, oko viših nivoa klasifikacije briofita ne postoji jasan konsenzus.

Brojnost briofita nije zasigurno utvrđena. Smatra se da su po brojnosti briofite na drugom mestu u okviru carstva biljaka, odmah iza cvetnica, a da se njihov broj kreće od 15000 (Gradstein *et al.* 2001) do 25000 (Crum 2001). Bez obzira na veliku brojnost, briofite su slabije ispitivana grupa biljaka, često zanemarivana prvenstveno zbog svoje veličine i proste građe. Briofite ne poseduju diferencirana provodna tkiva i organe, pa se stoga smatraju „nižim višim biljkama“ i po toj osobini nazivaju se atraheofite. Za razliku od njih, ostale više biljke nazivaju se traheofitama ili vaskularnim biljkama. Pored nedostatka pravih vaskularnih elemenata, briofite nemaju ni prava pokrovna, niti mehanička tkiva, a odsustvuju i preduslovi za njihovo stvaranje, kao što je prisustvo lignina kod traheofita. Posledica nedostatka lignina nije samo mala veličina briofita, već i nedostatak provodnih elemenata za transport mineralnih materija i asimilata, pa se usvajanje vode i hranljivih materija odvija uglavnom preko čitave površine talusa procesom osmoze i difuzije. Glavna karakteristika briofita je dominacija gametofit faze u životnom ciklusu, dok se pojedinačni sporofiti razvijaju na gametofitu, od koga su u potpunosti zavisni barem jedan deo životnog cilusa. Gametofit nema sekundarni rast i meristemska tkiva, već se formiranje novih delova tela dešava deobama jedne apikalne ćelije (Crum 1991).

Pored mnogobrojnih razlika, briofite imaju određene karakteristike slične i algama i vaskularnim biljkama, što u mnogome komplikuje razjašnjenje evolucije i filogenije briofita kao zasebne grupe. Zajedničke osobine algi i briofita se odnose na prisustvo talusa, nepostojanje diferenciranih provodnih tkiva, dominaciju gametofita u životnom ciklusu, kao i neophodnost vode u procesu razmnožavanja. Sa druge strane, razvoj embriona i postojanje višećelijskih složenih reproduktivnih organa, prisustvo sporopolenina u sporama i prisustvo flavonoida u ćelijama su karakteristike vaskularnih biljaka, koje odlikuju i sve briofite (Savidge 1996). Neke osobine koje karakterišu sve tri navedene grupe su prisustvo fotosintetičkih pigmenta hlorofila a i b, karotena i skrob, kao glavni oblik skladištenja asimilata.

Briofite su generalno poikilohidrične biljke, što znači da njihova hidratisanost u potpunosti zavisi od količine vode prisutne u neposrednoj blizini briofitskog organizma. Upravo zbog ove osobine briofite češće naseljavaju vlažna područja. Međutim, usled smanjenja vlažnosti na mikrostaništu, briofite postepeno gube vodu i smanjuju metaboličku aktivnost i prelaze u fazu mirovanja, odnosno, stanje anabioze. Veliki broj mahovina može da podnese kompletno isušivanje, a da sa uspostavljanjem povoljnih uslova vlažnosti gotovo trenutno povrate svoju funkcionalnost, odnosno da prođu kroz fazu oživljavanja (reviviscencije). Ova osobina svrstava ih u grupu biljaka vaskrsnica, gde se životni ciklus

naizмениčno odvija kroz smenu anabiotske obamrlosti i aktivne faze. Duga evoluciona istorija briofita i nepovoljni uslovi za život na kopnu su uslovlili sticanje različitih mehanizama za izbegavanje nepovoljnih uslova, među kojima je i suša. U okviru podcarstva Bryobiotina uočljive su određene specifičnosti karakteristične za manje grupe, posebno u morfo-anatomskom, biohemijskom i ekofiziološkom smislu.

## 1.2. Evolucija i filogenija briofita

Na osnovu dostupnih fosilnih podataka i rekonstrukcija evolutivnih događaja, pretpostavlja se da briofite vode poreklo iz Paleozoika, vremena pre oko 500 miliona godina, kada su vodeni biljni organizmi krenuli da naseljavaju kopno. Zbog svoje nežne i krhke građe, veoma je mali broj fosilnih dokaza danas poznat. Najstariji fosil briofita je tzv. devonska jetrenjača, *Pallavicinities devonicus*, koja potiče iz gornjeg Devona (pre oko 370 miliona godina) (Hueber 1961). Poznato je još nekoliko fosilnih ostataka jetrenjača iz doba Karbona, kao što je *Hepatices kidstoni*, slična rodu *Treubia* i *Thallites willsi*, slična današnjem rodu *Metzgeria*. Među navedenim fosilima nisu pronađeni reproduktivni organi, iako postoji velika sličnost u vegetativnim organima sa recentnim rodovima. U Karbonu se javljaju i prvi fosili pravih mahovina (Bryophyta), među kojima je najstariji poznat *Muscites polytrichaceus*. Najveći broj fosilnih ostataka pronađenih širom Evrope potiče iz Kenozoika, Severne Amerike i Azije, što ukazuje na to da su u to vreme postojale sve poznate evolutivne linije briofita, kao i to da je u ovom periodu došlo do širenja njihovih areala (Cooper *et al.* 2012).

Sve briofite zajedno sa traheofitama, čine grupu pod nazivom Embryophyta. Generalno je prihvaćeno da su embriofite monofiletskog porekla, dok su odnosi u okviru grupe briofita, kao i poreklo briofita, opisani različitim hipotezama. Jedna grupa naučnika smatra da mahovine vode poreklo od zelenih algi, a kao dokaze navode postojanje istih tipova hlorofila, skroba, celuloznih ćelijskih zidova i flagelatnih spermatozoida. Veliki broj biohemijskih i molekularnih analiza ukazuje na srodnost embriofita i zelenih algi (Zygnematales), kao i pršljenčica (Coleochaetales i Charales) (Becker & Marin 2009). Druga teorija se oslanja na sličnosti sporangija i polnih organa briofita i prvih kopnenih biljaka, rinija (Rhyniophyta), navodeći da su briofite od njih nastale nekom vrstom redukcije. Veoma značajan podatak je postojanje stoma u sporofitu mnogih mahovina i složeni polni organi, što je čvrst dokaz da ovakve složene strukture nisu mogle nastati nezavisno dva puta u evoluciji. Bez obzira na debate o postojećim hipotezama, briofite nesumnjivo zauzimaju bazalno mesto u filogeniji kopnenih biljaka, čiji je procvat počeo pre oko 400 miliona godina, u Devonu (Mishler 2001).

Mnogobrojni dokazi ukazuju na parafiletsko poreklo tri glavne grupe briofita. Podaci dobijeni morfološkim (Garbary *et al.* 1993) i molekularnim (Nishiyama *et al.* 2004) analizama ukazuju da jednu kladu čine prave mahovine i jetrenjače (zajednički se označavaju kao setafite), a da je njima sestrinska klada - rožnjače ili da sve tri grupe čine jednu kladu. Analiza distribucije mitohondrijalnih introna grupe II ide u prilog parafiletskoj hipotezi. Ona pretpostavlja da se u embriofitskoj kladi prvo izdvajaju jetrenjače, zatim prave mahovine, pa rožnjače, a kao poslednje traheofite (Qiu *et al.* 2006; Qiu *et al.* 2008).

U zavisnosti od analiza koje se koriste može se doći do različitih zaključaka o srodnosti klasa unutar podcarstva Bryobiotina. Crum (2001) je na osnovu biohemijskih i morfoloških razlika izdvojio Sphagnophyta kao poseban razdeo, dok su morfološke, razvojne, anatomske i genske analize podržale koncept monofiletskog porekla Bryopyta, pravih mahovina uključujući rod *Sphagnum* (Newton *et al.* 2000). Čini se da se svakim novim saznanjem u potpunosti menja odnos do sada uspostavljenih klada u

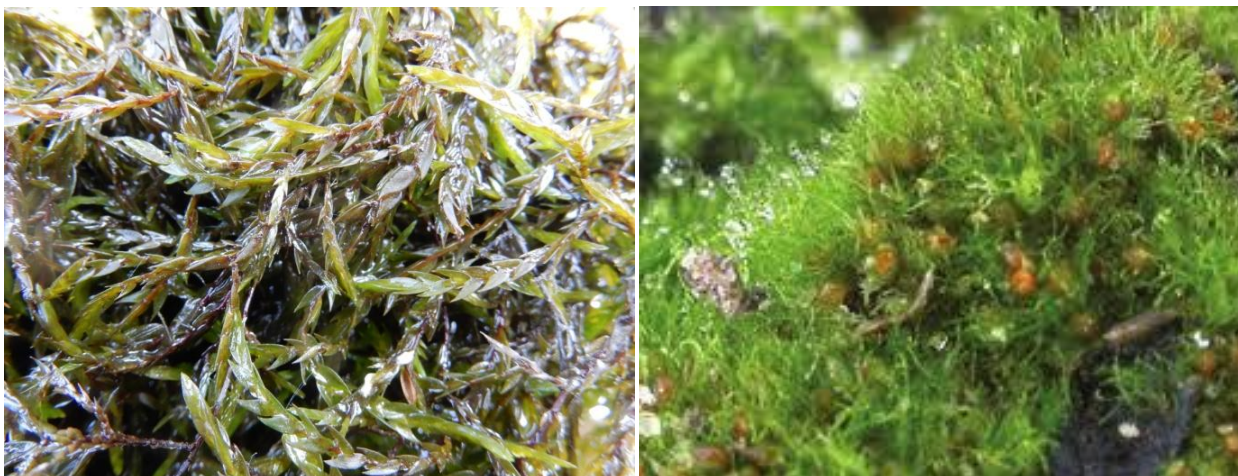
okviru biljnog carstva. Postoji mogućnost da će u budućnosti doći do izmena u okviru kladograma i da će na naše iznenađenje biti izdvojene grupe koje na prvi pogled i nemaju puno toga zajedničkog.

### 1.3. Rasprostranjenje i diverzitet briofita

Briofite se odlikuju velikim diverzitetom i široko su rasprostranjene, pa se mogu naći u različitim geografskim oblastima i staništima. U najvećoj meri naseljavaju stene, zemšljiste, drveća, prostore oko jezera, močvara i bara. Kolonizuju staništa od suvih pustinja do visokih planinskih vrhova, čak i mesta sa dužim zadržavanjem leda i snega (Oliver *et al.* 2005). Mogu naseljavati i vodenu sredinu, izuzev mora. Međutim, razne vrste tolerantne na prisustvo povećane koncentracije soli se mogu naći na obalama koje zapljuskuju morski talasi, kao što su *Schistidium maritimum*, *Tortela flavovires*, *Ulota phyllantha* i *Trichostomu brachydontium* (Ćosić *et al.* 2019). Prisustvo briofita na ovakvim staništima ukazuje na postojanje specifičnih mehanizama koji im omogućavaju život na takvim staništima (Sabovljević *et al.* 2016a). Praktično, briofite su prisutne svuda, ali najveći biodiverzitet se zapaža u relativno vlažnim područjima svih geografskih zona, posebno na obalama reka, potoka i jezera, sredinama koju zapljuskuje slatka voda, kao i na stenama preko kojih teče voda, vodopadima. U okviru slatkovodnih sistema, na dubini oko 60 m pronađene su vrste roda *Bryum*, *Meesia*, *Thamnobryum* i *Drepanocladus*, dok se vrste roda *Fontinalis* mogu sresti i na dubinama od oko 120 m. Pored briofita koje se pričvršćuju za supstrat, ima i flotantnih formi, kao što je talusna jetrenjača *Ricciocarpos natans* (Schofield 2002). Iako su briofite u znatnoj meri zavisne od prisustva vode, one nastanjuju i veoma suva i topla staništa. Vlaga vazduha i podloge neophodna je za fertilizaciju i reprodukciju, ali ne u tolikoj meri u kojoj se smatralo. Veliki broj vrsta je znatno tolerantan na sušu i mogu dugo biti u fazi mirovanja, anabioze gametofora ili protoneme ili u obliku spora, a veoma efikasno koristiti kratke vlažne periode u toku godine. Poznate su i pustinje koje permanentno naseljavaju mahovine gde dominiraju kserofilni oblici roda *Tortula*. Neke vrste naseljavaju veoma specifična staništa kao što su životinjski ostaci, kvarcni šljunak i pesak i staništa bogata teškim metalima. Međutim, retka staništa na kojima briofite nisu identifikovane su staništa sa pokretnim supstratom, tj. erozijom i pustinje sa visokim koncentracijama hloridnih i sulfatnih soli.

Areali mahovina su znatno širi nego areali cvetnica, što je posledica evolutivne starosti grupe, kao i značajne ekološke i biološke specifičnosti. Pošto su briofite najčešće kosmopolitske vrste, veoma je redak striktni endemizam za razliku od drugih biljaka. Retki endemiti su pronađeni na ostrvu Tasmanija (*Vandiemena ratkowskiana*) (Furuki & Dalton 2008) i Tanzaniji i Keniji (*Renauldia lycopodioides*) (O'Shea 2006). Smatra se da je za ovako široko rasprostranjenje zaslužan specifičan mehanizam disperzije i razmnožavanje putem spora, ali i aseksualno razmnožavanje rasplodnim telašcima – gemama (*gemmae*).

Briofite su male, sitne biljke, koje često rastu u grupi formirajući žbunaste ili jastučaste forme na supstratu. Retko se sreću biljke duže od 2 cm, kao što je *Dawsonia superba*, koja može dostići i do 70 cm u dužinu ili *Polytrichum commune*, koji raste izuzetno do 50 cm (Glime 2007). Ipak, vrste roda *Fontinalis* se odlikuju dužinom i do 2 m i naseljavaju vodena staništa (Slika 1a). Neke forme su dugačke samo par milimetara, kao što su vrste roda *Ephemeropsis*, *Ephemerum* (Slika 1b) i *Viridivellus pulchellum* (Crum 2001; Glime 2007). Među jetrenjačama je najsitnija vrsta roda *Monocarpus*, čiji je talus veličine od 0,5-2 mm.



Slika 1. Vrste a) *Fontinalis antipyretica* (najveća poznata mahovina) i b) *Ephemerum minutissimum* (najmanja poznata mahovina)

(Slika 1a: autor Sabovljević Marko, slika 1b preuzeta sa sajta:

<https://websites.rbge.org.uk/bbs/activities/mosses/Ephemerum%20serratum-minutissimum.pdf>)

Jedan od razloga zašto su briofite male veličine jeste nemogućnost sinteze lignina (Héban 1977). Međutim, utvrđeno je da u ćelijskim zidovima različitih vrsta briofita postoje jedinjenja slična ligninu (eng. lignin-like) (Crum 2001; Edelman *et al.* 1998). Ova jedinjenja pripadaju klasi polifenola, koji su derivati tri-hidroksibenzena (Wilson *et al.* 1989).

Već je napomenuto da su briofite po brojnosti druge u carstvu biljaka, odnosno, da broje preko 25000 vrsta (Sabovljević *et al.* 2016a). Brojnost po razdelima prema Shaw *et al.* (2011) je takva da su najbrojnije mahovine 13000-18000 vrsta, zatim jetrenjače oko 8500 vrsta, pa rožnjače oko 240-300 vrsta. Na teritoriji Srbije je zabeleženo 797 vrsta briofita od kojih 661 vrsta pripada mahovinama, 135 jetrenjačama, a samo jedna vrsta rožnjačama (Pantović & Sabovljević 2017).

#### 1.4. Životni ciklus briofita

Briofite se odlikuju dominantnom haploidnom fazom u životnom ciklusu, za razliku od traheofita kod kojih dominira diploidni sporofit. S obzirom na to da je gametofit prisutan veliki deo životnog ciklusa, sporofit se razvija na njemu i biva sitan ili neugledan, često „parazitirajući“. U gametofit generaciji se proizvode gameti, a sporofit generacija je diploidna faza u kojoj nastaju haploidne spore. Gametofit je specifičan, zelen, obično uspravan i ima mogućnost fotosinteze i usvajanja mineralnih materija i vode, za razliku od gametofita cvetnica, koji učestvuje samo u procesu reprodukcije. Gametofit dakle čine protonema i zelena biljčica, dok bi samo zeleni listasti deo mogao da se označi kao gametofor, jer će se na njemu u nekom trenutku naći gameti. Sa druge strane, sporofit mahovina ima ulogu samo u donošenju i disperziji spora i za razliku od traheofita, sporofit je unisporangijatan i determinantan (Glime 2007).

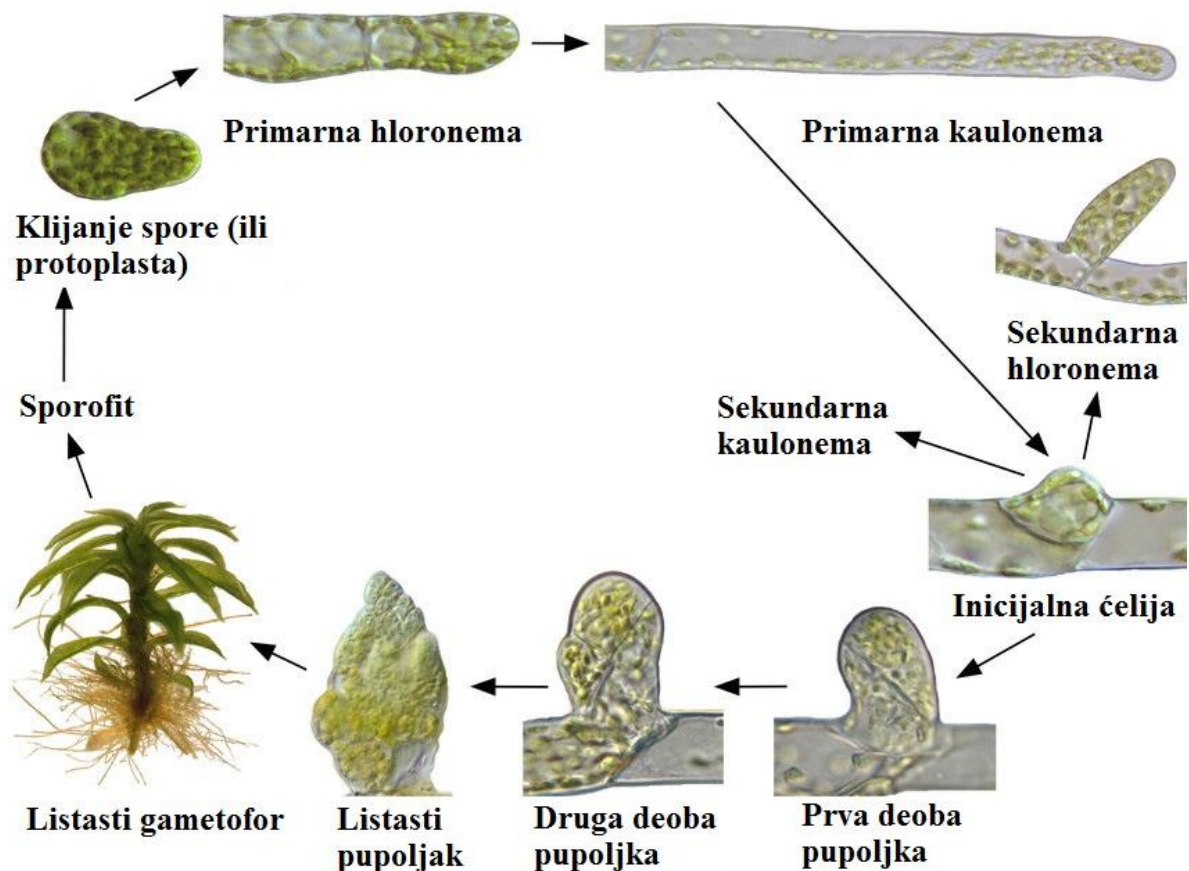
Životni ciklus briofita započinje klijanjem jednoćelijske, haploidne spore, pri čemu nastaje gametofit. Neke briofite odlikuje genetička determinacija spora na muške i ženske, pa se ponekad opisuju kao heterospore, iako one to zaista nisu, s obzirom na to da se formiraju u jednoj sporangiji. Nekada su muške i ženske spore različite veličine, pa se nazivaju anizospore (Mogensen 1981). Kod

većine predstavnika spore klijaju egzosporno, odnosno, zid spore puca usled širenja protoplasta pre deobe. Međutim, kod nekih kao što su *Andreaea*, *Drummondia* i *Leucodon* klijanje spore je endosporno, tj. deobe se dešavaju pre oslobađanja spore i pucanja zida (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began 2007). Klijanjem spore zapravo nastaju dve vrste gametofita, koje odlikuju veoma različite životne forme i zahtevi za rastenje i razviće (Glime 2007). Prvo se razvija višćelijska, često razgranata, končasta tvorevina – protonema, prilikom serija deoba apikalne ćelije. Druga vrsta gametofita predstavlja listasto ili talusno vegetativno telo – gametofor, koji se formira na protonemi.

Protonema je u prvim fazama razvoja briofite glavno mesto gde se odvija razmena informacija sa spoljašnjom sredinom. Razlikuju se dva tipa protoneme: primarna, koja nastaje direktno iz spore i sekundarna, koja nastaje kao rezultat regeneracije ćelija gametofita ili čak sporofita kada se menja njen nivo ploidijske. Protonema se primarno sastoji iz dva tipa filamenata, koji se odlikuju specijalizovanim ćelijama: hloroneme i kauloneme. Hloronema sadrži više hloroplasta i uglavnom služi za fotosintezu i sintezu hranljivih jedinjenja, zelena je i polegnuta po podlozi i ima uspravne zidove između susednih ćelija, dok kaulonema ima kose ćelijske zidove, manje hloroplasta, a služi prvenstveno za kolonizaciju supstrata i usvajanje nutrijenata, crvenkasno-braonkaste boje i horizontalnog rasta (Menand *et al.* 2007; Crandall-Stotler & Bartholomew-Began 2007). Prvo nastaje hloronema, a kasnije u razviću dolazi do dejstva hormona auksina i diferencijacije ćelija u kaulonemu. Nakon toga, dolazi do formiranja pupoljaka iz kojih se formira gametofor. Značajno je napomenuti da se ćelije protoneme mogu diferencirati u ćelije tmeme, koje služe za odvajanje delova protoneme i povećavanje šanse preživljavanja nepovoljnih uslova ili ćelije brahicite, koje omogućavaju preživljavanje pojedinačnih protonemalnih ćelija, koje će po nastupanju povoljnih uslova dati novu protonemu, a kasnije i celu biljku. Protonema je obično kratkoživeća i može da se degraduje po formiranju gametofora, mada kod nekih vrsta može biti perzistentna i nastaviti da postoji oko gametofora (npr. *Poronatum urnigerum*) ili kao kod roda *Buxbaumia*, može opstati kao vegetativna faza ceo životni ciklus (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began 2007). Naime, kod roda *Buxbaumia* sporofiti se razvijaju direktno na protonemi. Treba napomenuti da je kod roda *Sphagnum* protonema talusna, odnosno da je pravilnije nazivati je protalijum.

Na protonemi se formira jedan ili više pupoljaka iz kojih nastaju talusne tvorevine kod jetrenjača (kod nekih i listaste) i rožnjača ili listaste tvorevine kod mahovina. Razviće pupoljaka odlikuje složen mehanizam sa učešćem fitohormona auksina i citokinina (Bopp 1977). Obično se više kauloida razvija sa jedne protoneme, tako da cela kolonija gametofita biva poreklom od jedne spore. Gametofiti se najčešće razvijaju u grupi, u busenastim ili jastučastim formama, čime se okupira veći prostor, omogućava lakše ublažavanje nepovoljnih uslova, lakša kontrola hidratisanosti i pospešuje razmnožavanje (Veljić *et al.* 2018).





Slika 2. Životni ciklus vrste *Physcomitrella patens* (Slika preuzeta i modifikovana iz publikacije Roberts *et al.* 2012).

Listast kauolid koji nastaje sa protoneme nastavlja da raste kroz mitotičke deobe apikalne ćelije i meristemskih ćelija. Deobe uslovljavaju spiralno formiranje filoida na kauloidu. Kod mahovina se grane formiraju iz „pupoljaka“ u pazuhu filoida, što veoma podseća na formiranje pupoljaka na protonemi. Grananje kauloida je uslovljeno deobom apikalne ćelije i grane se uvek formiraju u pazuhu filoida. Kod pleurokarpnih mahovina, filamenti razvijeni na kauloidu se nazivaju pseudoparafilije ili makroneme, u zavisnosti da li podsećaju na hloronemalne ili kaulonemalne filamente (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began 2007). Pleurokarpne mahovine su polegale, kauloidi se razvijaju blisko supstratu i odlikuju se bočnim grananjem i perihecijumom, koji se formira na svakoj pojedinačnoj bočnoj grani. Akrokarpne mahovine su uspravne forme, koje se ne granaju ili retko granaju simpodijalno, dok se perihecijum formira samo apikalno. Kladokarpne mahovine produkuju perihecijum na vrhu nespecijalizovane bočne grane, koja ima mogućnost da se dalje grana nezavisno od drugih grana.

Nakon rasta i sazrevanja gametofora, na njemu se razvijaju polni organi (gametangije). Ženski polni organi se nazivaju arhegonije, a muški anteridije. Obično se gametangije raspoređuju u grupama, zajedno sa sterilnim nitima (parafizama), koje služe kao zaštita od isušivanja. Često se okolo gametangija javljaju specijalne zaštitne tvorevine, pa imaju karakterističan oblik. Arhegonije su flašolikog oblika. Suženi vratni deo je izgrađen iz jednoslojnog kanala gde postoje trbušno-kanalne i vratne ćelije, čija je uloga da osluzave prilikom sazrevanja arhegonije i omogućavaju otvaranje kanala za prolazak spermatozoida. U trbušnom, proširenom delu arhegonije se nalazi jajna ćelija. Anteridije imaju oblik duguljastih ili ovalnih meškova postavljenih na kratkoj dršci. U unutrašnjosti spermatozogenih ćelija se razvijaju pokretni, obično biflagelatni spermatozoidi.

Po nastupanju visoke vlažnosti vazduha i prisustva dovoljno vlage, dolazi do oplodjenja jajne ćelije. Spajanje gameta i formiranje zigota se odvija u arhegoniji. Diploidni zigot nakon nekog vremena podleže mitotičkim deobama pri čemu se razvija sporofit, odnosno, sporogon. Osim u zigotu, mitoza se odvija i u arhegoniji, pa nastaju zaštitne tvorevine sporogona, kao što je kaliptra ili kapuljača. Sporofit je relativno jednostavne građe. Čine ga čahura (sporangija), drška (seta, pedicela) i stopalo, kojim se pričvršćuje za gametofit. U sporangijama se odvijaju mejotičke deobe sporogenog tkiva (arhesporijuma) i nastaju haploidne spore. Kod nekih vrsta se obrazuju i elatere, sterilne tvorevine koje pomažu u disperziji spora. Nakon što sporofit sazri, dolazi do pucanja čahure i spore se oslobađaju u spoljašnju sredinu. Mahovine se razlikuju po mehanizmu otvaranja čahure koji je često *species* – specifičan. Nakon nekog vremena u povoljnim uslovima dolazi do klijanja spore i formiranja protoneme, čime se zaokružuje životni ciklus briofita.

Briofite, kao i druge biljke, mogu biti jednodome, noseći i anteridije i arhegonije na istoj jedinki ili dvodome, kod kojih se javlja isključivo jedan tip polnih organa (ili anteridije ili arhegonije). Međutim, kod dvodomnih vrsta se relativno često uočava polni dimorfizam, pri čemu su ženske jedinke uvek krupnije.

#### 1.4.1. Vegetativno razmnožavanje briofita

Veoma je bitno napomenuti da pored polnog razmnožavanja briofite odlikuje visok stepen vegetativnog (aseksualnog) razmnožavanja, koje se dešava na različite načine u povoljnim uslovima za vegetativni rast. Ovo može biti jedan od razloga zbog čega sporofiti nekih vrsta, odnosno populacija, nisu ni primećeni. Pored ćelija gametofita, polazno tkivo za vegetativno razmnožavanje može biti sporofit, čime se menja nivo ploidije kod novih jedinki (Veljić *et al.* 2018).

Longton & Schuster (1983) navode nekoliko osnovnih oblika aseksualne reprodukcije: razvoj više pupoljaka sa protoneme, odumiranje starijih delova i separacija mladih, razvoj više kauloida putem rizoma i stolona, razviće gametofora iz rizoida, regeneracija iz fragmenata i produkcija specijalizovanih propagula. Frey & Kürschner (2011) navode tri glavna oblika koji se sreću danas: regeneracija iz specijalizovanih organa (filoida, vrhova filoida, kauloida, grana, bulbila) i produkcija specijalizovanih propagula (gema, protonemalnih bradicita, tubera); fragmentacija delova biljaka u nespecijalizovane fragmente; i klonalna reprodukcija iz grana, stolona i rizoma. Vegetativno razmnožavanje je ključno za kolonizaciju staništa i održavanje na staništu. Herben (1994) navodi da je zapravo mikrostanište ključni faktor od koga zavisi vegetativno razmnožavanje i da vrste koje nastanjuju mala, nestabilna staništa zapravo češće pribegavaju ovom načinu razmnožavanja.

Kod mnogih vrsta se javlja samo jedan tip vegetativnog razmnožavanja, dok se kod drugih može javiti i više tipova, kao što je *Bryum* ili *Riccia* (Glime 2007). Disperzija vegetativnih propagula je pasivniji proces od oslobađanja spora. Spore omogućavaju veće širenje, dok se vegetativne dijaspore zapravo ne prenose na veća rastojanja i obično se razmnožavaju blizu roditeljske biljke u istoj sredini.

Fragmentacija je najjednostavniji način bespolnog razmnožavanja. Kod rodova *Riccia* i *Anthoceros* je najzastupljeniji način fragmentacijom starijih delova talus. Odbacivanje vrhova grana se često javlja u uslovima suše kod *Riccia*, čime je omogućeno da svaki vrh može da se razvije u novu biljku u povoljnim uslovima. Odbačeni delovi koji nastaju odumiranjem talusa ispod njih se često koriste kao metod razmnožavanja kod *Scapania undulata* i *Syntrichia caninervis* (Glime 2007). *Marchantia* i *Riccia* koriste metod razmnožavanja adventivnim granama sa ventralne strane gametofita koje se mogu otkinuti i dati nove gametofite. Regeneracija iz listova je zapažena kod *Polytrichum*



*commune*, *P. juniperum*, a ustanovljeno je da je veoma često i kod *Atrichum undulatum* i *A. angustratum* (Glime 2007). Neki fragmenti se mogu dispergovati putem snega i leda i kotrljati se kao loptice, pa se stoga zovu „moss balls“.



Slika 3. Gema na filoidima kod *Lophozia ventricosa* (levo) i protonema *Physcomitrella patens* sa tmema ćelijom (desno). (Slika levo preuzeta iz knjige „Bryophyte Ecology“ autora Glime 2007).

Specijalizovane strukture – gema ili propagule se generalno obuhvataju nazivom rasplodna telašca (eng. brood bodies) i odnose se na jednoćelijske ili višećelijske nediferencirane strukture koje se lako odvajaju od vegetativnog tela.

Najzastupljenije specijalizovane propagule su gema (Slika 3 levo). Oblik, način nastanka i način disperzije se razlikuju među vrstama. Kod *R. glauca* gema se razvijaju na vrhu rizoida, dok se kod *Marchantia* i *Lunularia* razvijaju na posebnim mestima na talusu koji su tanjirastog odnosno polumesečastog oblika, u kojima se nalaze brojne gema i najčešće se rasejavaju kišom, odnosno kada kišna kap pogodi ovu strukturu. Kod *Anthoceros glandulosus* se formiraju na obodima ili dorzalnoj strani talusa. Gema su višećelijske, zelene i odvajaju se sa filoida, vrha kauloida ili rizoida kod *Funaria*, za razliku od gema nekih drugih vrsta gde su jednoćelijske. Gema imaju pigmentisane i zadebljale ćelijske zidove i mogu se proizvoditi na različitim delovima tela, kao što su sa vrha kauloida kod *Aulacomnium*, aksila filoida kod predstavnika roda *Didymodon*, sa površine filoida kod predstavnika roda *Orthotrichum* ili rizoida i protoneme kao što je slučaj kod roda *Zygodon* (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began 2007). Propagule se, sa druge strane, mogu javiti na vrhu kauloida kao što je slučaj kod roda *Platygyrium* ili u pazuhu filoida kod roda *Leptobryum* (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began 2007).

Rizoidalne gema se nazivaju tuberi i njima se razmnožava veliki broj briofita. Tuberi se formiraju na obodima talusa *Riccia discolor*, *R. billarderi*, *Anthoceros hallii*, *A. pearsoni* ili kod vrsta rodova *Bryum* i *Dicranella*. Tuberi sazrevaju u nove taluse u povoljnim uslovima.

Takođe, vegetativno razmnožavanje je moguće i primarnom protonemom kao kod predstavnika roda *Funaria*. Protoneme se mogu izdeliti u manje delove, pri čemu je svaki zaseban fragment sposoban da izraste u novu protonemu. Pored primarne, sekundarna protonema se može razviti iz rizoida ili bilo kog drugog dela gametofita. Na njoj se javljaju pupoljci i dalje novi gametofit. Ovaj fenomen je veoma zastupljen kod *Funaria hygrometrica*, ali i kod drugih mahovina iz familije Funariaceae.

## 1.5. Morfo-anatomske karakteristike briofita

Briofite su mahom višegodišnje biljke, dok se jednogodišnje sreću znatno ređe. Zbog nedostatka lignina i diferenciranih tkiva i organa, najčešće su sitne i neretko se na staništu mogu prevideti. Međutim, generalni plan građe je sličan između različitih grupa briofita, iako je u znatnoj meri različit od traheofita. Kao što je već naglašeno, gametofit je fotosintetički aktivan i preko celog tela gametofora se odvija usvajanje vode i mineralnih materija procesom difuzije. Ovakav način usvajanja i razmene materija je omogućen zbog nepostojanja kutikule. Kod mahovina i nekih jetrenjača gametofor je listast, dok je kod jetrenjača i rožnjača taloidan, spljošten. Građa vegetativnog tela mahovina se razlikuje od traheofita u tome što pravi koren, stablo i listovi odsustvuju kod briofita zbog nedostatka diferenciranih tkiva. Međutim, strukture koje se razvijaju - rizoidi, kauloid i filoidi, su slične forme, ali ne uvek i funkcije, kao i navedeni analogni organi kod traheofita.

Rizoidi su tvorevine slične korenu vaskularnih biljaka, mada njihova primarna funkcija nije usvajanje vode, već pričvršćivanje za podlogu. Oni su končaste tvorevine, izgrađene od jedne ili nekoliko ćelija. Usvajanje vode i mineralnih materija se može vršiti kroz rizoide, ali se one ne mogu sprovesti do gametofora ili se to dešava usporeno i sporo. Dlakaste strukture se često razvijaju sa rizoidima i gusto obrastaju kauloide (*tomentum*), pa se na ovaj način zadržava kapilarna voda uz kauloid, kao što je zapaženo, na primer, kod vrste *Tomentypnum nitens* (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began 2007). Rizoidi su obično crvenkasno-braonkaste boje, višećelijski i sa kosim ćelijskim zidovima, koji su glatki ili sa papilama. Kod akrokarpnih mahovina su postavljeni na bazi kauloida, dok su kod pleurokarpnih raspoređeni duž kauloida na mestima koja su u kontaktu sa supstratom.

Kauloid je analog stablu traheofita, međutim, on nema istu funkciju, prvenstveno zbog razlike u građi ove dve strukture. Građa kauloida se obično sastoji od epidermalnih ćelija, ćelija kore i centralnog dela, a retko kod nekih grupa postoje sa tankozide, provodne ćelije. U retkim slučajevima, mogu se javiti delimično diferencirana provodna tkiva u kauloidu, kao što je među vrstama razdela Polytrichopsida. Ona su označena kao leptom i hadrom, i to su strukture preteče floema i ksilema vaskularnih biljaka, koje služe za efikasnije sprovođenje vode, mineralnih materija i asimilata kroz biljku. Na površini kauloida retko se sreće sloj epikutikularnih voskova ili voštani depoziti slični kutikuli, najčešće kod malobrojnih endohidričnih mahovina (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began 2007). Debeli ćelijski zidovi epidermalnih ćelija su česta pojava kod mahovina, koje pretežno imaju ulogu u očuvanju hidratisanosti tela mahovina. Međutim, kod predstavnika iz familije Pottiaceae epidermalne ćelije su tankozidne i nabrekle, pa formiraju jednoslojni zaštitni hijalodermis.

Filoidi se umnogome razlikuju u morfo-anatomskom smislu od pravih listova, ali imaju ekvivalentnu funkciju. Naime, u filoidima se odvija fotosinteza na isti način kao i kod traheofita. Obično su izgrađeni od jednog sloja ćelija, dok je središnji nerv (*costa*) često izgrađen od više slojeva. Oblik filoida je veoma varijabilan, a oblik ćelija oboda filoida je često taksonomski karakter.

### 1.5.1. Karakteristike rožnjača (Anthocerotophyta)

U okviru glavnih klasa briofita postoje značajne razlike u morfologiji i anatomiji. Vegetativno telo rožnjača je u obliku dorzo-ventralno spljoštenog talusa, bez diferenciranih tkiva, zelene do plavozelene boje. Talus je po obodu obično izgrađen iz jednog ili nekoliko slojeva ćelija, dok u sredini znatno zadebljava, što uslovljava specifičan rozetast oblik. Epidermalne ćelije su sitne i ne poseduju kutikulu. Na dorzalnoj strani talusa, kao i na sporogonu se mogu uočiti stome slične onim kod

traheofita. Međutim, nije potvrđeno da stome na talusu učestvuju u razmeni gasova kao stome na sporogonu (Veljić *et al.* 2018). Ispod epidermalnih ćelija se nalazi nekoliko slojeva parenhimatičnih ćelija sa povremenim prisustvom ćelija koje ispunjava sluz. Ono što generalno razlikuje ovu grupu od ostalih briofita je prisustvo pojedinačnih, pločastih hloroplasta sa pirenoidima ili skrobnim zrnima u ćelijama. Ova karakteristika je pleziomorfan karakter i uočava se kod većine predstavnika rožnjača (Goffinet & Shaw 2009). Pored toga, rožnjače poseduju uljane ćelije, ali ne poseduju uljana telašca unutar ćelija, za razliku od jetrenjača. Unutar talusa roda *Anthoceros* se uočavaju intercelulari sa otvorom prema ventralnoj strani, koji su ispunjeni sluzi. Sa ventralne strane se nalaze prosti, jednoćelijski rizoidi. Sporofit se razvija unutar talusa i kod većine vrsta je izgrađen iz duge, cilindrične kapsule, stopala i meristemskog sloja između njih, dok seta odsustvuje. Novonastali rogoliki sporogon poseduje centralni stub (kolumelu), koji ima mehaničku funkciju (Slika 4a). Mladi sporogon je zelene boje, vrši fotosintezu, pa je stoga sposoban za samostalan način ishrane. Zanimljivo je i to da je često prisustvo kolonija modrozelenih algi *Nostoc* u talusnim otvorima, lakunama, što ovu grupu briofita čini jedinstvenom zbog ove vrste simbioze koju ostvaruje (Veljić *et al.* 2018).

### 1.5.2. Karakteristike jetrenjača (Marchantiophyta)

Jetrenjače se karakterišu velikom raznovrsnošću oblika i građe gametofora. On može biti taloidan ili sa oformljenim izdankom sa filoidima. Talusni oblici mogu biti veoma prosti, kao kod *Sphero carpus* i *Pellia* ili složeni kao kod reda Marchantiales. Veličina ove klase varira od nekoliko mikrometara, pa do 15-25 cm kod vrste *Dumortiera*. Postoji nekoliko formi gametofita u okviru jetrenjača. Kod reda Jungermanniales talus poseduje središnje rebro (stabaoce) i listolike režnjeve (listiće). Metzgeriales i Pelliales se odlikuju dorzo-ventralno spljoštenim talusom, jednostavne građe, koji se sastoji od centralnog nerva i dva bočna krila. Najsloženija građa se zapaža kod reda Marchantiales, čiji je najznačajniji predstavnik *Marchantia polymorpha* (Slika 4c). Kod ove vrste je talus dorzo-ventralno spljošten, visoko diferenciran, dihotomo granat sa mnogobrojnim vazдушnim otvorima ili porama. Na dorzalnoj strani je prisutno asimilaciono tkivo sa vazдушnim komorama i porama, a na ventralnoj strani je tkivo za skladištenje i provođenje. Međutim, za razliku od rožnjača, jetrenjače ne poseduju stome na epidermisu. Jetrenjače sa složenom taloidnom organizacijom su obično višeslojnog talusa sa istaknutim nervom, višćelijskim rizoidima i specifičnim ljuspama, trigonima. Njihova glavna uloga je zaštita rizoida, ali i talusa, od isušivanja. U okviru talusa se nalazi tkivo hlorenhim, ćelije za magacioniranje i uljana telašca. Uljana telašca (eng. oil bodies) su specifične strukture za grupu jetrenjača i predstavljaju taksonomski karakter. U njima se sintetišu i akumuliraju najčešće jedinjenja iz grupe terpenoida i flavonoidnih glikozida (Crum 2001; Glime 2007). Sporofit se razvija na talusu i standardne je građe od drške i čahure. Čahura je višeslojna i okrugla, često tamne boje. Sporogon je pričvršćen stopalom za gametofit, koji često poseduje haustorijalnu kragnu (involucelum), poreklom od sete. Seta je bele boje kada je zrela i može se izdužiti značajno, što omogućava bolju disperziju spora. Oblik i struktura čahure među jetrenjačama je veoma varijabilan, pa stoga predstavlja značajan taksonomski karakter (Veljić *et al.* 2018).





Slika 4. Predstavnici klasa (a) rožnjača (*Anthoceros* sp.), (b) mahovina (*Physcomitrium pyriforme*) i (c) jetrenjača, muška biljka (*Marchantia polymorpha*).

(Slike preuzete sa sajtova:

[https://www.google.com/search?q=anthoceros+laevis&tbm=isch&ved=2ahUKEwihhIWdmcvuAhWF7qQKHx99BkgQ2-cCegQIABAA&oq=anthoceros+&gs\\_lcp=CgNpbWcQARgHMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATOgQIABBDOgUIABCxAzoECAAQAzOCCAA6BwgAELEDEEM6CAGAELEDEIMBOgQIABAEUNvBFIg\\_QRg4KAFAABWAHAgAGSAogBiw2SAQUyLjcuMpgBAKABAAoBC2d3cy13aXotaWInsAeAwAEB&scclient=img&ei=50QZYOH0DYXdkwX-pnABA&bih=732&biw=1583&rlz=1C1AOHY\\_srRS709RS709&hl=sr#imgrc=elOq4J81RvkIfM&imgdii=rwY2pEq28X4jaM\).](https://www.google.com/search?q=anthoceros+laevis&tbm=isch&ved=2ahUKEwihhIWdmcvuAhWF7qQKHx99BkgQ2-cCegQIABAA&oq=anthoceros+&gs_lcp=CgNpbWcQARgHMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATMgQIABATOgQIABBDOgUIABCxAzoECAAQAzOCCAA6BwgAELEDEEM6CAGAELEDEIMBOgQIABAEUNvBFIg_QRg4KAFAABWAHAgAGSAogBiw2SAQUyLjcuMpgBAKABAAoBC2d3cy13aXotaWInsAeAwAEB&scclient=img&ei=50QZYOH0DYXdkwX-pnABA&bih=732&biw=1583&rlz=1C1AOHY_srRS709RS709&hl=sr#imgrc=elOq4J81RvkIfM&imgdii=rwY2pEq28X4jaM).)

### 1.5.3. Karakteristike mahovina (Bryophyta)

Kod pravih mahovina, vegetativo telo je podeljeno na rizoide, kauloide i filoide (Slika 4b). Filoidi su jednostavni, bez drške, najčešće jednoslojni. Retko se javljaju višelojni, složeni filoidi, kod kojih se uočava heterofilija. To je često kod plagiotropnih mahovina i kod onih koje se specijalizovano vegetativno razmnožavaju filoidima. U sredini lista se obrazuje središnje rebro u okviru koga se izuzetno retko javlja diferencijacija na ćelije koje nalikuju onima za provođenje vode i mineralnih

materija i na one koje provode produkte fotosinteze, ali mu je osnovna funkcija mehanička, odnosno održavanje položaja filoida. Kod mahovina se, za razliku od rožnjača, retko javljaju stome na gametoforima, ali se javljaju na sporofitima. Oblik filoida je veoma raznovrstan, a posebno obod filoida. Čelije koje izgrađuju filoide se razlikuju u obliku i građi u zavisnosti koji deo izgrađuju, odnosno, čelije oboda filoida će se razlikovati od središnjih ćelija ili onih koje izgrađuju ploču. Filoidi mogu da budu glatki ili da sadrže papile i mamile. Kauloidi se razvijaju kao uspravni (ortotropni) ili horizontalni (plagiotropni) u odnosu na podlogu. Anatomska građa je najjednostavnija kod fenjerača (Andreaeopsida), a najsloženija kod vlasaka (Polytrichopsida). Na poprečnom preseku se uočavaju jednoslojni epidermis, kora i parenhimske ćelije, ukoliko postoji diferencijacija. Kora može imati mehaničku funkciju ili da služi za skladištenje skroba i vršenje fotosinteze. Epidermis svih mahovina je bez stoma, a pokriva ga struktura analogna kutikuli. Kauloid retko može biti obavijen tankom kutikulom, ali ona kod većine predstavnika nije izražena. Površina kauloida može da bude glatka ili sa različitim papilama. Posebno kod pleurokarpnih mahovina kauloid je prekriven filamentoznim ili folioznim parafilijama. Njihova glavna uloga je u povećanju stope fotosinteze i spoljašnjem provođenju vode kapilarnim silama. Takođe, nekada se javljaju i pseudoparafilije, ali samo na bočnim granama. Pseudoparafilije su različitog oblika, od končastih do listolikih i mogu se razviti blizu filoida ili duž kauloida. Kod nekih predstavnika kao što su vrste roda *Sphagnum*, epidermalne ćelije su tankih zidova (hijalinske ćelije) i formiraju hijalodermis. Čelije kore (sklereide) mogu formirati kontinuirani prsten i imaju mehaničku funkciju, a spoljašnje ćelije kore fotosintetičku funkciju. Centralni deo je građen od tankozidnih parenhimskih ćelija ili se može diferencirati u leptoidne i hadroide (centralni cilindar). Rizoidi se formiraju sa ventralne strane kauloida i generalno su višćelijski osim kod predstavnika roda Hypnobryales i vrsta roda *Takakia*, koji nemaju razvijen rizoidni sistem. Rizoidi mahovina su slični protonemama, iz razloga što se protoneme mogu razviti iz rizoida u uslovima svetla i povećane vlažnosti (Veljić *et al.* 2018). Sporofit mahovina je izgrađen iz drške, čaure i stopala. Čahura obično ima kaliptru, kapuljaču i odlikuje kolumelom (Goffinet & Shaw 2009; Veljić *et al.* 2018). Seta je varijabilne dužine. Generalno, oblik, boja i veličina sporofita i način otvaranja čaure su veoma raznoliki i predstavljaju svojevrstan taksonomski karakter.

Pored ovih glavnih klasa briofita, Sphagnopsida ili tresetnice su veoma specifične građe. One se odlikuju monopodijalnim grananjem i neograničenim vršnim rastom, pri čemu donji delovi biljke stalno odumiru i učestvuju u izgradnji treseta. Svetle su boje, bele ili žute do crvene, ali u suvom stanju uvek beličaste, pa je trivijalan naziv pod kojim ih možemo sresti bele mahovine. Rizoidi se javljaju samo na taloidnoj protonemi, dok kasnije odsustvuju (osim kod jedne vrste sa Nove Kaledonije). Grane na vrhu kauloida obrazuju veću ili manju kružnu strukturu, glavicu (capitulum). Na površini kauloida je omotač, kora, izgrađena od tankozidnih, hijalinskih ćelija, koje učestvuju u razmeni vode i služe kao rezervoari vode. Ispod kore se uočava nekoliko slojeva ćelija sa zadebljalim ćelijskim zidom koje grade skleroderm, a u središnjem delu je srž bez centralnog provodnog snopića. Na mestima gde se filoidi odvajaju sa kauloida nalaze se ampulaste ćelije koje služe za usvajanje vode. Filoidi su gusto postavljeni na granama, jednoslojni su, bez središnjeg rebra izgrađeni od hlorocita koje fotosintetišu i krupnijih neživih ćelija hidrocita, koje služe za magacioniranje atmosfere vode. Filoidi su po obliku dimorfni, pri čemu se razlikuju filoidi kauloida i filoidi grana. Sporofit poseduje loptastu čauru sličniju jetrenjačama, ali sa poklopcem i stomama, a izdiže se na lažnoj nožici tzv. pseudopodijumu sa gametofora. U čauri se takođe zapaža kolumela (Goffinet & Shaw 2009; Veljić *et al.* 2018).

## 1.6. Značaj briofita

Najveći značaj briofita se ogleda u ekološkom smislu, s obzirom na to da su bitna komponenta vegetacije kišnih šuma, močvara, planina i tundri. Često su dominantne vrste na staništima gde

vaskularne biljke odsustvuju, kao što su planinske litice, stene, izvorišta reka i potoka, zemljištima sa visokom koncentracijom teških metala. Pored toga, briofite su prvi kolonizatori zemljišta, golog kamenja, požarišta i jalovišta. Pojava mahovina kao što su *Polytrichum piliferum*, *P. juniperum* i *Ceratodon purpureus* na različitim tipovima zemljišta kao pionirskih vrsta široko je poznata. Na stenama su kao pioniri opisane vrste *P. piliferum* i *P. alpinum*, posebno po drobljenim stenama (Leach 1931). Pospešuju formiranje zemljišta u stepskim i šumskih staništima, ubrzavajući fizičko i hemijsko zadržavanje vode, vezujući organske i neorganske materije, čime direktno ubrzavaju dekompoziciju organskih materija. Mahovine su pogodne zbog toga što relativno brzo obrastaju velike površine golog supstrata i kontrolišu erozivne procese. Tome najviše doprinosi njihov kapacitet da zadržavaju vodu, pa je zato pravilo da mahovine rastu u regionima sa visokom vlažnošću i niskom stopom evaporacije. Na globalnom nivou, iako su veoma sitne, znatno doprinose formiranju biomase u različitim ekosistemima (Vanderpoorten & Goffinet 2009), ponajviše u tropskim, borealnim i arktičkim zonobiomima.

Kao prve makrofite koje kolonizuju prazne prostore, često su u zajednicama sa travama (Poaceae). Prilikom sukcesije ekosistema, posebno vodenih u kopnene, vrste roda *Sphagnum* sa rizomima šaša formiraju specifične strukture koje plutaju po vodi. Kasnije se na ovakvim strukturama mogu razviti i šumske zajednice.

Mahovine su često najzačajnija komponenta ekosistema, pa čak i onih najsirovijih. Njihovo prisustvo u ledenim pustinjama, epifitskom načinu života u šumama i tundrama zajedno sa lišajevima je nezamenljivo. Treset koji pokriva oko 3 % planete Zemlje je tip staništa gde mahovine roda *Sphagnum* dominiraju (Limpens *et al.* 2008). Formiranje i održavanje treseta je veoma značajno sa ekološke strane. Briofite su dominantna grupa biljaka u ovakvom staništu, posebno vrste roda *Sphagnum*. Pored njih, vodene mahovine *Drepanocladus* i *Scorpidium* značajno doprinose u prvim fazama formiranja treseta zbog toga što ubrzavaju akumulaciju organskih materija i sedimenata na dnu jezera i bara. Tresetišta su veliki depo ugljenika i stoga je bitno da budu nenarušena i održavana. Treset ima i ekonomski značaj, tj. koristi se u zemljoradnji i hortikulturi kao đubrivo, a može se koristiti i kao ogrev i izolator. Pored tresetišta, briofite su ključna komponenta u tundrama i močvarama, gde omogućavaju pravilno kruženje materije u prirodi, odnosno funkcionisanje biogehemijskih ciklusa karakterističnih za zonobiom u kome žive.

Briofite interaguju direktno sa drugim organizmima na različite načine. Krpelji, kolembrole i tardigrade u mahovinama nalaze stanište i hranu, ali i sklonište od predatora (Longton 1992). U polarnim regionima briofite mogu biti ključni izvor hrane za ptice i sisare kada nastupi surovi period godine. Smatra se da nemaju značaj u ljudskoj ishrani.

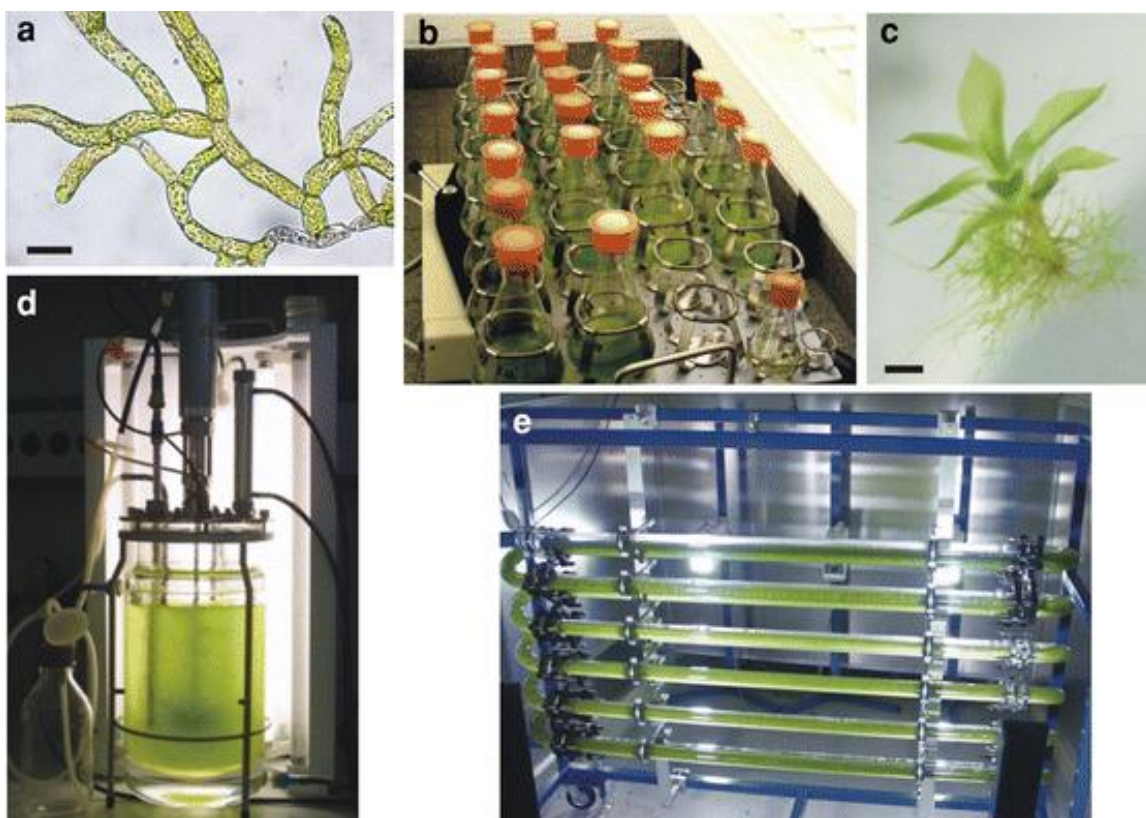
Međutim, zbog svoje sposobnosti da sintetišu veliki broj sekundarnih metabolita, korisne su u tradicionalnoj medicini za previjanje rana i opekotina. Takođe, u kineskoj tradiciji se koriste i kao začini, zbog produkcije ljutih supstanci sličnih kapsaicinu i piperinu ili izuzetno slatkih supstanci kao što je slučaj kod mahovina roda *Fissidens* i *Rhodobryum* (Asakawa *et al.* 2009). Briofite zauzimaju posebno mesto u kulturnom nasleđu Japana, s obzirom na to da postoji tradicija njihovog korišćenja u baštovanstvu i hortikulturi. Interesantno je da se minijturni pejzaži ispod bonsai drveća sastoje od mahovina, kao i to da se mahovine nalaze na zidovima zgrada kao ukras.

Zbog nepostojanja čvrste kutikule i zaštitinih slojeva epidermisa, telo mahovina je u direktnoj i konstantnoj vezi sa okolinom, pa su veoma osetljive na zagađivače u neposrednoj okolini. Briofite su, kao i lišajevi, dobar indikator zagađenja vazduha, vode i donekle zemljišta. Kada je u pitanju zagađenje vazduha, mogu se uočiti mahovinske pustinje, jer visok stepen zagađenja onemogućava preživljavanje



osetljivih vrsta. Takođe, prisustvo ili odsustvo određenih vrsta mahovina u vodenim staništima ukazuje na stepen zagađenja. Pored ovoga, mahovine se nekada koriste u biomonitoringu radioaktivnih elemenata. Danas se najviše koriste kao bioakumulatori teških i toksičnih metala u procesu fitoremedijacije.

Briofite su bitni model organizmi u fundamentalnim istraživanjima. Pogodne su za genetička istraživanja zbog jednostavne građe, relativno brze smene generacija i dominantnog haploidnog gametofita, ali i za proučavanje razvojnih procesa i morfogeneze. Međutim, glavna osobina koja ih čini primamljivim za molekularno-genetička istraživanja je visok stepen homologe rekombinacije jedarne DNK. Prvi i najznačajniji briofitski model organizam je vrsta *Physcomitrella patens* čiji je genom kompletno sekvenciran 2008. godine (Rensing *et al.* 2008). Ova vrsta se prilično lako gaji, relativno brzo umnožava na minimalnoj hranljivoj podlozi, relativno je krupna je i jednostavne građe. Zbog svih navedenih karakteristika *P. patens* se koristi u genetičkom inženjerstvu za proizvodnju mnogobrojnih proizvoda korisnih čoveku, kao što je na primer produkcija rekombinantnih farmaceutskih proteina (Decker & Reski 2007), od kojih su najpoznatiji vaskularni endotelijalni faktor rasta, faktori rasta keratinocita, hepatocita, eritropoetin i mnogi drugi. Olakšavajuća okolnost za biotehnologiju i proizvodnju velikih količina različitih proizvoda jeste poseban vid gajenja tečnih kultura *P. patens* u takozvanim bioreaktorima (Slika 5).



Slika 5. Uzgajanje *Physcomitrella patens* u tečnoj hranljivoj podlozi u bioreaktorima: (a) protonema; (b) tečne kulture protonema; (c) gametofor na čvrstoj hranljivoj podlozi; (d) protočni bioreaktor; (e) cevasti bioreaktor. (Slika preuzeta iz publikacije Decker & Reski 2007).

Iako su brojna grupa biljaka, briofite su ugrožene prvenstveno zbog destrukcije njihovih staništa širom sveta. Osetljive vrste ne tolerišu minimalne promene na staništu, pa su zbog toga pod visokim pritiskom i trebaju visok stepen zaštite. Zagađenje vazduha, vode i zemljišta takođe doprinosi nestanku

osetljivih i ugroženih vrsta. Prisustvo invazivnih vrsta i prekomerno sakupljanje mahovina dovodi do značajnog narušavanja staništa i smanjenja broja jedinki, ali i vrsta.

## 1.7. Fiziologija stresa kod biljaka

Svi činioci koji nepovoljno utiču na rastenje i razviće biljaka i koji smanjuju produktivnost na nivo niži od njihovog genetičkog potencijala se smatraju stresogenim faktorima (Nešković *et al.* 2010). Stresogeni faktori dovode do stanja stresa, odnosno, stanja biološkog sistema koje odstupa od optimuma. Učinak stresa na biljke se najčešće posmatra kroz promene u preživljavanju, rastenju i razviću i akumulaciji biomase. U zavisnosti od toga koji stres izazivaju stresogeni faktori, on se može definisati kao abiotički, biotički i antropogeni.

Abiotički stres podrazumeva negativno dejstvo neživih činioaca spoljašnje sredine na živi organizam. Faktori koji izazivaju ovaj tip stresa su: višak i nedostatak vode, visoke i niske temperature, visok ili nizak intenzitet svetlosti, visoka ili niska koncentracija kiseonika, jonizujuće zračenje i visoke koncentracije mineralnih soli u podlozi ili njihovo nedovoljno prisustvo. Iako mnogobrojni faktori mogu izazvati abiotički stres, veoma retko se može posmatrati izolovano dejstvo samo jednog faktora u prirodi. Oni obično deluju u kombinaciji, pa se češće govori o stresnom sindromu. Tako je nedostatak vode često udružen sa visokom temperaturom i visokim intenzitetom zračenja ili visoka koncentracija mineralnih soli sa nedostatkom vode u podlozi ili velika količina vode sa smanjenom koncentracijom kiseonika na staništu. Isti uslovi sredine ne deluju podjednako na sve vrste biljaka u datom prostoru. Dok su jedni uslovi za određenu vrstu stresni, druga vrsta može biti dobro prilagođena na njih, pa se često i odgovor biljaka na različite stresove razlikuje (Taiz & Zeiger 2010; Stikić & Jovanović 2012).

Stresogeni faktori mogu imati primarno dejstvo, ali i sekundarno, koje nastaje kao posledica delovanja primarnih faktora. Primarni stresovi nastaju direktno delovanjem navedenih faktora (stres suše, visokih i niskih temperatura, stres izazvan solima itd.), dok sekundarni stresovi, osmotski i oksidativni stres, bivaju indukovani primarnim stresogenim faktorima (Stikić & Jovanović 2012). Oksidativni stres je stanje koje nastaje kada je produkcija slobodnih radikala veća nego sposobnost antioksidativnih mehanizama da ih održi na niskom nivou. Osmotski stres nastaje usled pojave fizičke ili fiziološke suše, visokih ili niskih temperature ili prisustva povećane koncentracije soli u zemljištu, pa biljke ne mogu da usvoje vodu i održe ravnotežu između usvajanja vode i transpiracije.

Dejstvo stresogenih faktora kod osetljivih vrsta može biti letalno i subletalno ili se vrste mogu na različite načine adaptirati na uslove stresa. Reakcija biljke na faktore spoljašnje sredine je veoma složena, s obzirom na to da su biljke sesilni organizmi, pa su kroz evoluciju konstantno morale da se prilagođavaju novonastalim uslovima na staništu. Prvenstveno dolazi do prepoznavanja stresa od strane receptorskih molekula, što se najčešće dešava na nivou ćelijske membrane. Reakcija stoga otpočinje percepcijom signala stresa, vezivanjem signalnih molekula za receptore i primanjem informacije čime otpočinje signalna kaskada unutar ćelije, putem koje se informacija prenosi u jedro. U jedru dolazi do ekspresije gena ključnih za odgovor na stres (eng. stress-related genes ili eng. stress-responsive genes) i sinteze proteina stresa (Taiz & Zeiger 2010). Rezultat je specifična reakcija ćelije i tkiva na metaboličkom nivou i otpočinjanje fiziološke reakcije.

Određene vrste biljaka su se prilagodile na stresne uslove time što su razvile različite mehanizme za preživljavanje stresa, odnosno, mehanizme rezistencije ili otpornosti. Ovi mehanizmi obuhvataju toleranciju na stres i izbegavanje stresa, odnosno dugu istoriju usklađivanja organizama sa stanišnim uslovima, te specijalizaciju na karakterističan tip staništa.



Tolerancija na stres predstavlja fiziološki mehanizam kojim se omogućava metabolički normalno funkcionisanje biljke usled umerenog stresa ili se delimično smanjuje metabolička aktivnost usled intenzivnog stresa. Tolerancija se može ispoljiti kao adaptacija, genetički uslovljen skup osobina, ili aklimatizacija, koja nastaje postepenim prilagođavanjem biljke, pri čemu se date osobine ne prenose na potomstvo. Sa druge strane, izbegavanje stresa se ispoljava kao redukovana metabolička aktivnost i postojanje perioda mirovanja usled delovanja stresa.

### 1.7.1. Stres izazvan natrijum-hloridom

Zaslanjena zemljišta su prisutna u svim klimatskim regionima, od vlažnih, tropskih, pa do polarnih predela. Najčešće se takva zemljišta nalaze na obalama mora, estuara, mestima geoloških depozita, pustinjama i mestima sa intenzivnom evaporacijom usled suše (Singh & Chatrath 2001). Poreklo soli na ovakvim staništima je posledica primarne salinizacije, koja nastaje usled dugotrajnih geoloških procesa. Danas je, međutim, sve više prisutna sekundarna salinizacija, koja nastaje kao posledica antropogenog delovanja usled neadekvatne primene agrotehničkih mera, posebno navodnjavanja (Zhu 2007; Stikić & Jovanović 2012) ili usled posipanja asfaltnih puteva solima kako bi se otopio led (Singh & Chatrath 2001). Procenjeno je da je danas oko 7% kopna na planeti Zemlji zaslanjeno (Srivastava & Kumar 2014).

Zaslanjenost zemljišta se može razlikovati prema tipu soli koja je dominantno zastupljena. U tom slučaju se razlikuju sodicitet i salinitet (Szabolcs 1974). Sodicitet nastaje usled prisustva natrijum-hlorida (NaCl) i ovo je jedan od najzastupljenijih tipova zaslanjenosti danas. Salinitet, sa druge strane, nastaje kao posledica prisustva visokih koncentracija različitih jona, a dominantno je vezan za bazno zemljište zbog prisustva i natrijum-karbonata.

Joni  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  su toksični za biljke kada su prisutni u visokim koncentracijama i dovode do stresa izazvanog solima (Munns 2005). Visoke koncentracije  $\text{Na}^+$  mogu direktno da oštete biljke, ali i da izmene strukturu podloge, tako što smanjuju njenu poroznost i propustljivost za vodu. Mnogobrojne biljke ne mogu da nastanjuju zaslanjena zemljišta, pa se one nazivaju biljkama netolerantnim ili osetljivim na stres izazvan solima, tj. glikofitama (Glenn & Brown 1999; Xiong & Zhu 2002). Glikofite mogu preživeti određen nivo zaslanjenosti, ali iznad te kritične koncentracije soli, njihovo preživljavanje i rastenje je smanjeno ili onemogućeno (Carillo *et al.* 2011). Smatra se da glikofite ne preživljavaju ukoliko je u zemljišnom rastvoru koncentracija NaCl veća od 200 mM (Sairam & Tyagi 2004). Sa druge strane, biljke koje su se prilagodile životu na zaslanjenim područjima se nazivaju biljkama rezistentnim (otpornim) ili tolerantnim na stres izazvan solima, tj. halofitama (Flowers *et al.* 1986). Halofite se nalaze na ovim staništima zbog toga što im je visoka koncentracija soli neophodna za rastenje i razviće ili zbog slabije kompetitivnosti sa drugim biljkama, usled čega su razvile mehanizme tolerancije (Ungar 1991).

Na osnovu potrebe za prisustvom soli, halofite se dele na obligatne i fakultativne halofite (Sabovljević & Sabovljević 2007). Obligatne halofite zahtevaju soli za rastenje i razviće i bolje se razvijaju ukoliko su soli prisutne u podlozi. Fakultativne halofite obično rastu u zaslanjenim uslovima, ali mogu veoma dobro rasti i razvijati se bez prisustva soli ili ukoliko je prisutna veoma niska koncentracija soli u podlozi (Sabovljević & Sabovljević 2007). Prisustvo soli na ovakvim zemljištima nije jedini uslov za pravilno rastenje i razviće halofita, već je limitirajući faktor dostupnost vode i nutrijenata (Grigore *et al.* 2012). Ukoliko se u podelu uvrsti eko-fiziološki aspekt, halofite se mogu podeliti na obligatne, fakultativne i indiferentne halofite (Cushman 2001). Indiferentne halofite su sposobne da prežive povećanu koncentraciju soli u prirodi, ali bolje rastu i razvijaju se na podlogama

bez soli. Naime, ove vrste se zbog slabije kompetitivnosti povlače sa nezaslanjenih staništa, pa su zato dominantne na zaslanjenim podlogama (Cushman 2001; Ćosić *et al.* 2019). Interesantno je da u okviru iste vrste može postojati genetička razlika uslovljena životom na zaslanjenim i nezaslanjenim staništima (Nerić *et al.* 2015; Ćosić *et al.* 2019). Navedena podela se može primeniti na vaskularne biljke, ali i na briofite.

Podela na osnovu sadržaja soli (Steiner 1934) i na osnovu morfologije (Marchner 1995) je primenjiva isključivo na vaskularne biljke, prvenstveno zbog složenosti građe tela, ali i raznovrsnosti životnih formi. Na osnovu morfologije halofite se dele na one koje imaju sposobnost izlučivanja viška jona preko slanih žlezda i trihoma (eng. excretives) i na sukulente, koje akumuliraju veliku količinu vode u svom telu kako bi smanjile efekat toksičnosti (Weber 2008; Aslam *et al.* 2011; Stikić & Jovanović 2012). Na osnovu tipa staništa, halofite se dalje mogu podeliti na hidro-halofite i ksero-halorifite (Youssef 2009).

Među traheofitama veoma tolerantne na povećan salinitet su vrste familija Plumbaginaceae, Rhizophoriaceae, Tamariaceae i Chenopodiaceae, u koje spadaju rodovi širokog rasprostranjenja: *Atriplex*, *Salsola*, *Salicornia* i *Suaeda* (Stikić & Jovanović 2012). Sa druge strane, iako su poznate halofitne vrste među briofitama (brio-halofite), malo podataka postoji o njima. Mali broj vrsta briofita se zaista može opisati kao prave halofite. Čak i vrste koje naseljavaju obale, koje zapljuskuje slana voda, često ne preživljavaju tretman slanom vodom (Boerner & Forman 1975). Jedna od najpoznatijih brio-halofita je vrsta *Schistidium maritimum*, koja raste na kamenju u zoni gde je intenzivan sprej poreklom od morske vode. Veoma tolerantne vrste su *Ulota phyllantha* i *Tortella flavovirens*, koje se često nalaze zajedno sa *S. maritimum* (Bates 1975; Ćosić *et al.* 2019). Interesantno je da brakičnu vodu naseljavaju jetrenjače roda *Riella* i da nesumnjivo bolje rastu u prisustvu elektrolita u *in vitro* uslovima (Sabovljević *et al.* 2016b). U slanoj morskoj vodi nisu pronađene briofite, osim vrste *F. dalecarlica*, koja naseljava severne delove Baltičkog mora. Moguć razlog zbog čega ova vrsta preživljava potopljena u morsku vodu je taj što je koncentracija soli u Baltičkom moru manja nego u nekim drugim morskim vodama (Söderlund *et al.* 1988). Mnogo su brojnije vrste koje naseljavaju obale i supralitoralnu zonu. Sa druge strane, u suvim zaslanjenim područjima Evrope rastu retke i ugrožene vrste *Entosthodon hungaricus* i *Hennediella heimii*, kao i *Bryum algovicum* (Zechmesiter 2005; Papp *et al.* 2016; Sabovljević *et al.* 2012). Za vrstu *E. hungaricus* je utvrđeno da pripada fakultativnim brio-halofitama (Sabovljević *et al.* 2018), dok se za vrstu *H. heimii* smatra da je takođe fakultativna brio-halofita. Na suvim, zaslanjenim područjima Grčke se može naći *B. subapiculatum* (Papp 2002), dok *B. argenteum* veoma dobro podnosi zaslanjenost zemljišta pored puteva u urbanim sredinama.

Interesantno je zapažanje da je vrsta *B. antarticum* sposobna da akumulira soli i da ih izlučuje na površinu svog tela na sličan način kao vaskularne biljke. To je pretpostavljeno na osnovu kristala soli pronađenih na površini filoida. Međutim, to nije dodatno proučavano, a sa druge strane, kristali mogu biti posledica adkrustracije depozita koji su donešeni vetrom (Longton 1988). Pored toga, vrste za koje se ne smatra da su halofite, kao što je *F. hygrometrica*, pokazuju neke osobine koje karakterišu halofite. Naime, klijanje spora ove vrste nije osetljivo na visoke koncentracije soli primenjene na spore pre početka isključavanja (Vargas *et al.* 2017).

### 1.7.2. Efekti stresa izazvanog solima na biljke

Visoke koncentracije soli u zemljišnom rastvoru utiču na rasteenje, razviće i preživljavanje biljaka prvenstveno dovodeći do pojave osmotskog i jonskog stresa (Stikić & Jovanović 2012).

Osmotski stres nastaje usled toga što rastvorene soli u neposrednoj okolini korena snižavaju osmotski i vodni potencijal zemljišta, čime je onemogućeno pasivno usvajanje vode od strane biljke. Na ovaj način se remeti vodni balans biljke, ravnoteža između apsorpcije vode i transpiracije, usled čega nastaje fiziološka suša, odnosno, pojava da ima dovoljno vode, ali da biljka zbog sniženog vodnog potencijala tla ne može da je usvoji. Usled smanjenog usvajanja vode, opada turgorov pritisak u ćelijama, dolazi do njihove dehidratacije, a posledično i inhibicije deoba i izduživanja ćelija. Navedeni efekti soli su slični efektima koje ima vodni deficit na biljke, pa je i odgovor sličan u oba slučaja.

Jonski stres nastaje usled povećane akumulacije soli natrijuma, hlorida i sulfata, koja uslovljava poremećen odnos jona  $K^+$  i  $Na^+$ . Povećana koncentracija jona i poremećena ravnoteža jona je toksična za biljku i inhibitorno deluje na mnogobrojne procese. Specifični jonski efekti su povećana propustljivost membrana, promena jonske homeostaze i poremećeni metabolički procesi, što uslovljava redukciju rastenja i razvića. Naravno, veoma je čest nastanak sekundarnog oksidativnog stresa, produkcije reaktivnih oblika kiseonika (ROS), koji mogu biti destruktivni za ćelijske biomakromolekule (Taiz & Zeiger 2010; Stikić & Jovanović 2012).

Umereno visoke koncentracije soli ne ispoljavaju svoje efekte momentalno i direktno, već se joni akumuliraju u biljkama, pa kada dostignu određene vrednosti dolazi do navedenih negativnih efekata. Redukcija rastenja izdanka se odvija u dve faze kod vaskularnih biljaka prema mehanizmu za dvofazni odgovor (Munns 2005; Carillo *et al.* 2011). To je model koji se zasniva na reakcijama tolerantnih i osetljivih biljaka na stres izazvan solima, a koje se međusobno razlikuju po brzini dostizanja toksične koncentracije soli u listovima. U prvoj fazi dolazi do osmotskog stresa, smanjenog usvajanja vode, zatvaranja stoma i redukcije rastenja. Ovo je brzi odgovor i dešava se svega nekoliko minuta po postizanju granične toksične koncentracije u zoni korena. Taj granični nivo je približno 40 mM NaCl za većinu biljaka ili čak i manje za osetljive vrste. Na osmotski stres su najosetljiviji mladi izdanci i listovi. Druga faza je sporija, odvija se nedeljama ili mesecima. Dolazi do redukcije rastenja zbog akumulacije soli u listovima, što odgovara efektima koje ima jonski stres. Efekat je primarno vidljiv na starijim listovima, koji imaju smanjenu sposobnost akumulacije jona u vakuoli. Izražena je senescencija listova, a često i odumiranje delova biljaka ili čak celih biljaka (Munns & Tester 2008). Redukcija rastenja kod mladih listova nastaje usled smanjene produkcije organskih jedinjenja u fotosintezi (Carillo *et al.* 2011).

Stres izazvan solima negativno utiče na sve aspekte biljnog rastenja i razvića i metabolizma. Veliki broj biohemijskih i fizioloških procesa biva narušen, što dovodi do promena na nivou pojedinačnih ćelija, ali i na nivou celog organizma. Na ćelijskom nivou, prve promene se zapažaju na nivou membrana, gde je poremećen transport materija, ali i na nivou citoplazme u kojoj se menja aktivnost enzima. Aktivnost protonske pumpe na plazmalemi je inhibirana usled povećane koncentracije  $Na^+$ , što direktno utiče na održavanje jonske ravnoteže i transport jona. Joni  $Na^+$  kompetiraju sa jonima  $K^+$  za mesto na transporteru za kalijum, pa ukoliko se  $Na^+$  dominantno vezuje dolazi do promene aktivnosti enzima i biosinteze proteina za koje je  $K^+$  neophodan. Sa druge strane, manje je poznato kako deluju joni hlora. Predloženo je da odnos  $Cl^-$  i  $NO_3^-$  može uticati na smanjenje unosa azota, koji je bitan za sintezu mnogobrojnih jedinjenja i proteina (Wu & Li 2019). Akumulacija jona  $Na^+$  ima negativan efekat na stabilnost i propustljivost ćelijske membrane, pošto u visokim koncentracijama može zameniti mesta sa  $Ca^{2+}$ , pa na taj način usloviti izlazak  $K^+$  iz ćelije (Stikić & Jovanović 2012; Taiz & Zeiger 2010).

Inhibicija fotosinteze i disanja je neminovna usled stresa izazvanog solima. Fotosinteza je prvenstveno inhibirana zatvaranjem stoma i smanjenim usvajanjem  $CO_2$ , ali i usled akumulacije jona

$\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  u hloroplastima. Glavni efekat koji se zapaža je smanjena produktivnost biljke. Na nivou hloroplasta postoji značajna razlika u odnosu tipova hlorofila kod biljaka koje su izložene stresu izazvanom solima. Naime, kod većine biljaka u optimalnim uslovima obično postoji više hlorofila a, nego hlorofila b, dok prilikom stresa izazvanog solima, njihov odnos postaje ujednačeniji zbog opadanja koncentracije hlorofila a (Mane *et al.* 2010). Efikasnost fotosistema II, pa time i prenos elektrona kroz elektron-transportni lanac u fotohemijskoj fazi je smanjena. Soli utiču i na smanjenje aktivnosti RuBisCo enzima, pa se i biohemijaska faza odvija sporije (Stepien & Klobus 2005). Često se u hloroplastima zapaža formiranje slobodnih radikala usled ometenog prenosa elektrona u linearnom transportu, prvenstveno superoksid anjon radikala ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) i hidroksil radikala ( $\cdot\text{OH}$ ). Singlet kiseonik ( $^1\text{O}_2$ ) se formira u blizini fotosistema II, dok vodonik peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nastaje primarno u drugim kompartmanima ćelije (Parida & Das 2005; Ahmad *et al.* 2010, 2011). Oksidativni stres je uobičajena pojava, pri čemu se remeti aktivnost antioksidativnih enzima, koji održavaju ROS na niskom nivou, pa stoga ROS reaguju sa makromolekulima u ćeliji i izazivaju peroksidaciju lipida, oksidaciju proteina, oštećenja DNK, inhibiciju aktivnosti enzima (Parihar *et al.* 2015). Pored ROS, često se proizvode i reaktivni oblici azota (RNS), kao što je azot-monoksid (NO).

Na nivou cele biljke se može zapaziti smanjena apsorpcija i akumulacija nutrijenata (Rogers *et al.* 2003). Usled nakupljanja soli u zemljištu dolazi do snižavanja pH, pa je pravilno usvajanje mikroelemenata onemogućeno (Zhu 2004). Poremećen je i metabolizam ugljenih hidrata, kao i azotnih jedinjenja, što se ogleda i u smanjenoj sintezi nukleinskih kiselina.

Slični efekti stresa izazvanog solima su zabeleženi i kod briofita. Visoke koncentracije soli dovode do vodnog i osmotskog stresa, što izaziva inhibiciju ekspanzije ćelija i deobe, kao što je slučaj i kod vaskularnih biljaka (Munns 2002; Flowers 2004). U dosadašnjim eksperimentima se pokazalo da se prilikom egzogeno dodanih soli NaCl, svi parametri morfogeneze smanjuju, tj. da dolazi do inhibicije formiranja novih izdanaka, pupoljaka i sekundarne protoneme. Preživljavanje osetljivih vrsta veoma brzo opada, dok tolerantne vrste preživljavaju, ali ne rastu značajno u uslovima intenzivnog ili dugotrajnog stresa (Vujičić 2016; Ćosić *et al.* 2019). Niske koncentracije soli mogu pospešiti rast halofitnih vrsta, ali značajno smanjuju mogućnost preživljavanja osetljivih vrsta. Pored morfogenetiskih parametara, brojni fiziološki i biohemijaski parametri se menjaju pod uticajem visokih koncentracija soli. Fotosintetska aktivnost je posebno osetljiva na NaCl, pošto joni  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  mogu oštetiti membrane tilakoida, deaktivirati enzime, razgraditi hlorofil i poremetiti elektron transportni lanac (Chaves *et al.* 2009). Uticaj na fotosintezu se ogleda u promeni odnosa hlorofila a i hlorofila b, smanjenoj sintezi pigmenta na visokim koncentracijama soli, što doprinosi smanjenju ukupnih hlorofila, kao i kod vaskularnih biljaka. Ovakve promene su dobro dokumentovane kod briofita (Bogdanović *et al.* 2009a, 2009b, 2011; Nerić *et al.* 2014; Vujičić 2016). Kod vrsta osetljivih na povećanu koncentraciju soli evidentno je smanjenje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja, kao i promena metabolizma ugljenih hidrata (Vujičić *et al.* 2015). Sa druge strane, sadržaj ukupnih fenola može i da raste u uslovima stresa ili da ostane relativno nepromenjen, a to zavisi od vrste, trajanja stresa, tipa tretmana, koncentracije soli, faze razvića i vremena u kome se meri sadržaj fenola (Navarro *et al.* 2006; Kim *et al.* 2008).

### **1.7.3. Odgovor biljaka na stres izazvan solima i mehanizmi odbrane od stresa izazvanog solima**

Generalno gledano, biljke odgovaraju na povećan salinitet na fiziološkom i molekularnom nivou (Munns & Tester 2008). Traheofite su tokom evolucije razvile različite anatomske adaptacije na povećanu koncentraciju soli na staništu, dok su briofite stekle mehanizme tolerancije koji su aktivni

isključivo na ćelijskom nivou. Pojedinačne ćelije reaguju veoma brzo na prisustvo soli u podlozi i na taj način doprinose toleranciji cele biljke (Ćosić *et al.* 2019). Takođe, mehanizmi odbrane od stresa izazvanog solima mogu biti indukovani ili konstitutivni (Pastori & Foyer 2002). Mehanizmi tolerancije na stres izazvan solima kod vaskularnih biljaka su detaljno proučeni i na ćelijskom i na molekularnom nivou (Parida & Das 2005), dok su isti mehanizmi manje poznati i opisani kod briofita, ali se danas intezivno ispituju. Kod vaskularnih biljaka mehanizmi odbrane od stresa izazvanog solima obuhvataju mehanizme tolerancije na osmotski stres i na jonski stres, kojima je cilj smanjenje ili izbegavanje negativnih efekata koje navedeni stresovi imaju na biljke.

Uopšteno, tolerancija na osmotski stres predstavlja sposobnost biljke da toleriše nedostatak vode i dehidraciju tkiva, a da istovremeno održava rast listova i otvorene stome. Najčešći mehanizam koji biljke koriste je osmotsko prilagođavanje. Osmotsko prilagođavanje podrazumeva aktivni transport jona iz citoplazme u vakuolu i sintezu organskih jedinjenja u citoplazmi, kako bi se održao turgorov pritisak. Organska jedinjenja koja se sintetišu u citoplazmi su neutralna, hidrofilna jedinjenja koja ni u visokim koncentracijama ne štete metabolizmu ćelije. Oni se nazivaju kompatibilni rastvori ili osmoliti. Primarna uloga je održavanje ravnoteže između visoke koncentracije soli van ćelije i visoke koncentracije  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  u vakuoli. Najčešći sintetisani osmoliti su šećeri (fruktoza, saharoza, glukoza, traheloza, rafinoza i fruktani) (Bohnert & Jensen 1996), alkoholni šećeri (manitol, glicerol, sorbitol), aminokiseline i njihovi derivati (prolin, glicin betain, alanin betain, prolin betain), amini i sulfatne komponente (Yokoi *et al.* 2002). Drugi mehanizam tolerancije na osmotski stres jeste prelazak na neki drugi tip metabolizma kao što je CAM (eng. Crassulacean Acid Metabolism) metabolizam, kako bi se omogućio pravilan rad fotosintetičkog aparata i stvaranje energije.

Dodatna sinteza organskih jedinjenja u okviru osmotskog prilagođavanja nije povoljna za energetski bilans biljaka, pa se kod halofita kao adaptacije često javljaju otpornije membranske strukture i makromolekuli, povećan sadržaj glikolipida, sterola i saturisanih masnih kiselina u fosfolipidima, što sve doprinosi održavanju integriteta membrana (Taiz & Zeiger 2010).

Tolerancija na jonski stres podrazumeva smanjivanje mogućnosti da soli dospeju u biljku. Ukoliko prekomerna količina jona dospe u biljku, koriste se mehanizmi koji transportuju soli van citoplazme. Posebno je značajan mehanizam kompartmentizacije jona u vakuolu, čime se smanjuje toksičan efekat jona na enzime u citoplazmi. Međutim, na ovaj način se vrši i osmotsko prilagođavanje ćelije, koje je ključno u toleranciji na osmotski stres. Kontrola transporta i kompartmentizacije jona je veoma složena. Isayenkov & Maathuis (2019) ističu postojanje tkivne tolerancije kod vaskularnih biljaka, koja se oslanja na mehanizam kompartmentizacije jona u vakuolu.

Jonsku homeostazu u citoplazmi je neophodno održavati i to prvenstveno kontrolisanjem koncentracije jona  $\text{Na}^+$ . To se najčešće postiže putem transportera kojima se pojačava efluks, izbacivanje  $\text{Na}^+$  van ćelije i transportera kojima se smanjuje inluks, odnosno usvajanje  $\text{Na}^+$  u ćeliju.  $\text{Na}^+$  se iz citoplazme aktivno transportuje u vakuolu ili van ćelije procesom detoksikacije (ekstruzije) uz pomoć  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportera. Kontrola citoplazmatskog  $\text{Na}^+$  se ostvaruje preko regulacije odnosa  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  ili  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  u citoplazmi, što se postiže transportom  $\text{Na}^+$  u vakuolu, kao što je već napomenuto, ili akumulacijom  $\text{K}^+$  u citoplazmi (Zhu 2001). Time se održava  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  homeostaza. Većina biljaka poseduje mehanizme za izbacivanje i kontrolu koncentracije  $\text{Na}^+$ , ali ne i  $\text{Cl}^-$ . Dosadašnja istraživanja samo sugerišu postojanje mehanizama za kontrolu koncentracije  $\text{Cl}^-$  u korenu i stablu *Arabidopsis thaliana* (Wu & Li 2019). To je verovatno u vezi što je  $\text{Na}^+$  toksičniji za većinu ispitivanih biljaka nego  $\text{Cl}^-$  (Zhu 2001). Halofite obično koriste kontrolisano odlaganje jona u kompartmente kako bi se održao osmotski potencijal ćelija i tkiva (Flowers & Yeo 1986; Cheeseman 1988).

Međutim, pored održavanja homeostaze na ćelijskom nivou, traheofite održavaju homeostazu i na nivou transporta  $\text{Na}^+$  ksilemom iz korena ka listovima. Postoje mehanizmi kojima se obezbeđuje postepena akumulacija soli u okolnim tkivima tokom transporta vode i jona. Redistribucija  $\text{Na}^+$  iz ksilema u floem je još jedan veoma značajan put smanjenja koncentracije  $\text{Na}^+$ . Međutim, jedan od najbolje opisanih mehanizama kod halofita je izlučivanje viška soli ukoliko se one akumuliraju u nadzemnim organima. Ovaj mehanizam je čest kod biljaka koje poseduju slane žlezde ili modifikovane trihome, ali i koje imaju mogućnost odbacivanja tkiva u kome su akumulirane soli. Pored navedenih mehanizama, često se soli mogu akumulirati u tkivima bogatim vodom, kao što je slučaj kod određenih sukulentnih biljaka. Za razliku od glikofita koje pribegavaju mehanizmima održavanja homeostaze na nivou ćelija, halofite koriste mehanizme na nivou ćelija, organa i celih biljaka. Smatra se da glavna razlika između tolerancije glikofita i halofita potiče ne zbog značajne kvalitativne razlike, već zbog toga što su kvantitativno mehanizmi zastupljeniji kod halofita (Flowers & Colmer 2008; Maathuis 2014), kao i to da je njihova regulacija i aktivnost različita kod halofita u odnosu na glikofite (Muchate *et al.* 2016).

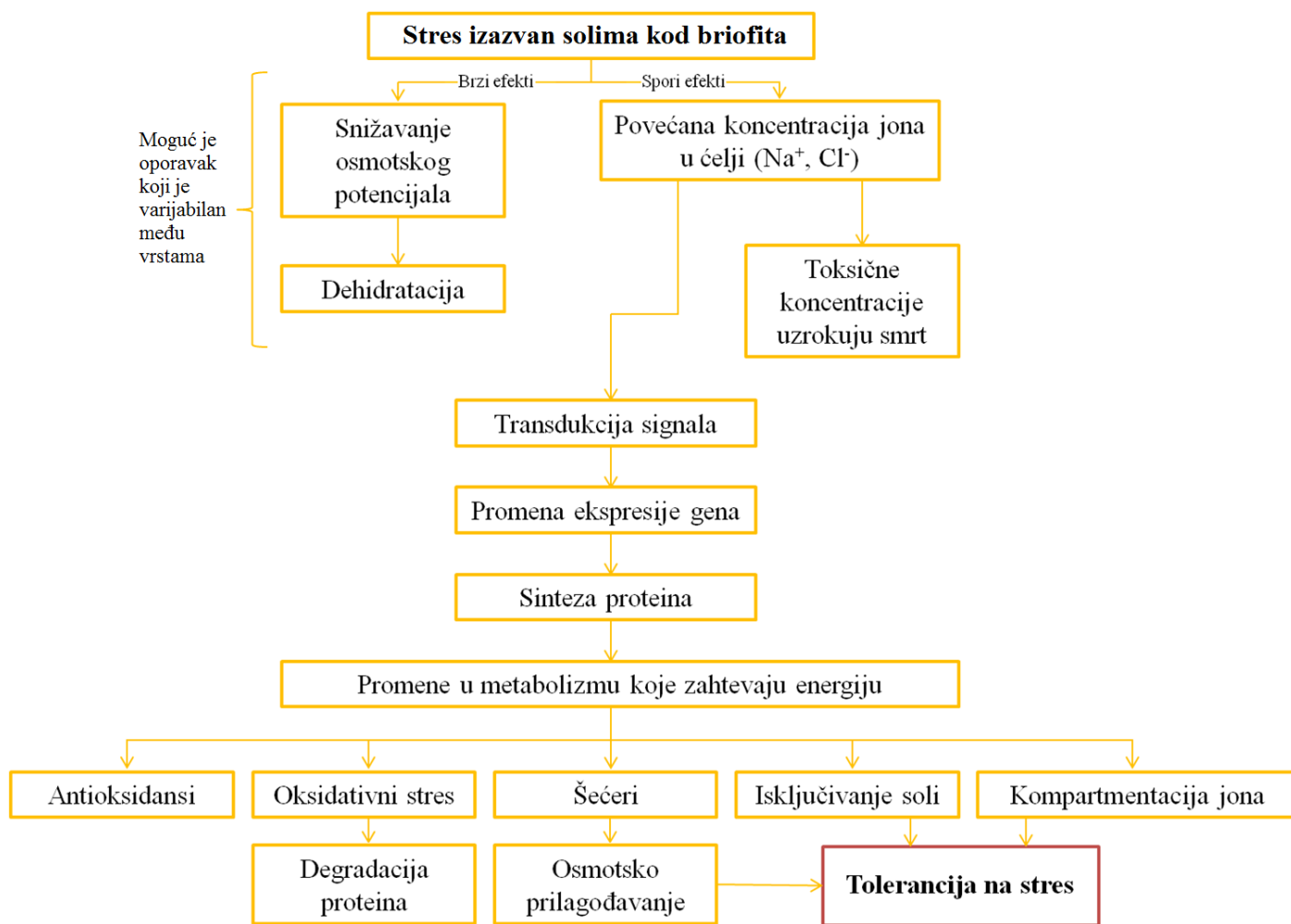
Dva glavna mehanizma otpornosti na soli kod briofita su izbegavanje povećane koncentracije soli i tolerancija na povećanu koncentraciju soli (Sabovljević & Sabovljević 2007; Ćosić *et al.* 2019). Mehanizmi tolerancije na stres izazvan solima kod briofita nisu detaljno proučeni, ali se pretpostavlja da odgovor briofita na stres pretpostavlja brzu percepciju i transdukciju signala, regulaciju transkripcije, održavanje jonske i osmotske homeostaze, kao i biosintezu zaštitnih jedinjenja i proteina (Wang *et al.* 2008a). Transmembranski proteini za transport jona imaju ključnu ulogu u jonskoj i osmotskoj homeostazi u uslovima stresa kod briofita. Molekularne i proteinske analize su pokazale da je nekoliko različitih signalnih komponenti transkripcionih regulatora uključeno u odgovor briofita na stres solima. Ovi proteini su fototropin, 14-3-3, protein kinaze i transkripcioni faktor PpDBF1 (eng. *Physcomitrella patens* Dehydration Binding Factor 1) (Wang *et al.* 2008a). Kod *P. patens* fototropin i 14-3-3 funkcionišu kooperativno kako bi regulisali  $\text{H}^+$ -ATP-azu i održavali jonsku homeostazu. Pored toga, odbrambeni proteini štite makromolekule od denaturacije i degradacije, kao i od oksidativnih oštećenja.

Među briofitama, *P. patens* je najproučavanija vrsta u oblasti fiziologije i molekularne biologije stresa. Pokazano je da ona poseduje visok stepen otpornosti na osmotski stres, stres izazvan solima i sušu u poređenju sa drugim biljkama koje se ne smatraju halofitama (Sunkar *et al.* 2003). Mnogobrojni geni su opisani kod vrste *P. patens*, a pokazano je da su homologe sa genima kod vaskularnih biljaka. Neki od tih gena imaju osnovnu ulogu u zaštiti ćelija od ekstremnih uslova nastalih usled izlaganja biljaka više različitih tipova abiotičkog stresa (Holmström *et al.* 2000). Mehanizmi tolerancije briofita i vaskularnih biljaka su u mnogim segmentima slični, a pokazano je da su i evolutivno konzervisani. Analize transkriptoma *P. patens* pokazale su da 24% gena nije prethodno zavedeno u genomsku bazu *P. patens* (Rensing *et al.* 2002), a upravo ti geni su specifični za briofite i toleranciju stresa. Visok stepen tolerancije stresa se kod briofita objašnjava prisustvom  $\text{Na}^+$ -pumpe, koja nije prisutna kod vaskularnih biljaka (Kroemer *et al.* 2004).

Uopšteno, tolerancija na stres izazvan solima uključuje modifikacije na ćelijskom nivou, što podrazumeva ekspresiju gena za različita jedinjenja na molekularnom nivou (Aslam *et al.* 2011). Mehanizmi uključuju promenu osmotske i jonske homeostaze, sintezu proteina, promene u metabolizmu, osmotsko prilagođavanje i akumulaciju fitohormona apscisinske kiseline (ABA). Međutim, ovi mehanizmi nisu detaljno opisani kod briofita, iako postoji značajan broj komponenti koje omogućavaju navedene mehanizme (Ćosić *et al.* 2019). Sa druge strane, glavni mehanizmi tolerancije na stres izazvan solima kod vaskularnih biljaka se dele detaljno u nekoliko grupa: 1) održavanje jonske

homeostaze i kompartmenizaciju, 2) transport i usvajanje jona, 3) biosintezu osmoprotektivnih i kompatibilnih jedinjenja, 4) aktivaciju antioksidativnih enzima i sintezu antioksidanasa, 5) sintezu poliamina, 6) generisanje RNS i ROS i 7) modulaciju fitohormona (Gupta & Huang 2014).

Pored ovih specifičnih regulatornih mehanizama tolerancije na stres, briofite se koriste i strategijom izbegavanja stresa na više načina. Najčešće biljke odumiru i skraćuju svoj životni ciklus ostavljajući za sobom veoma tolerantne dijaspore, koje će klijati u povoljnijim uslovima (Thompson 1978). U tom slučaju, period mirovanja je u uslovima suše i povećane koncentracije soli. Neke vrste, kao što je *Aloina sp.* imaju sukulentnu građu kao vid adaptacije na uslove životne sredine (Ćosić *et al.* 2019). Pretpostavlja se da se voda i soli akumuliraju u vakuoli da bi se u citoplazmi održavao nizak jonski sadržaj. Ipak, za razliku od vaskularnih biljaka, kod briofita nema slanih žlezda ili trihoma kojima bi se vršila ekskrecija soli (Sabovljević & Sabovljević 2007). Izbegavanje stresa kod vaskularnih biljaka je fenomen gde biljka pokušava da jone isključi iz tkiva i ćelija različitim transporterima u tkiva koja će potencijalno odbaciti (Allen *et al.* 1994), što kod briofita nije zabeleženo. Joni se mogu pasivno isključiti promenom permeabilnosti membrane, ali je češći način aktivno izbacivanje jona pumpama ili razblaživanjem koncentracije jona unutar tkiva tako što se usvaja veća količina vode (Allen *et al.* 1994), kao što je već navedeno. Glavni efekti stresa izazvanog solima i mehanizmi tolerancije na stres kod briofita su prikazani šematski na slici 6.



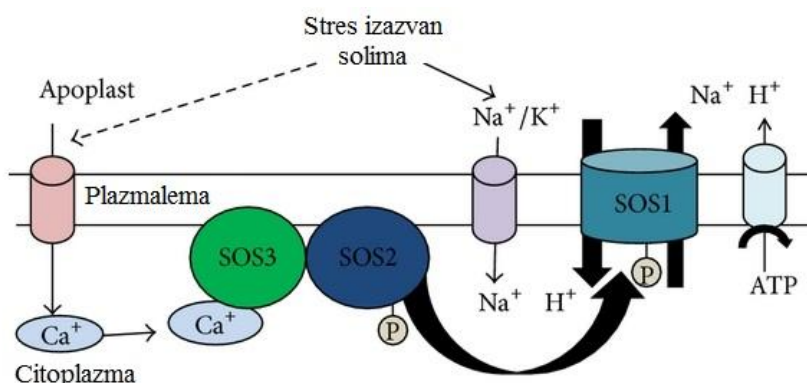
Slika 6. Šematski prikaz efekata stresa izazvanog solima i mehanizama tolerancije na stres kod briofita (modifikovano prema publikaciji Ćosić *et al.* 2019).

### 3.1.2.1. Održavanje jonske i osmotske homeostaze

Održavanje balansa jona, njihovo usvajanje i kompartmentizacija u vakuole je od velikog značaja za biljke i u optimalnim i u stresnim uslovima. Poremećena ravnoteža jona, koju uzrokuju pre svega  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ , dovodi do hiperosmotskog stresa i jonske toksičnosti u ćelijama i tkivima.  $\text{Na}^+$  kompetira sa  $\text{K}^+$  za mesto na transporteru i u velikoj meri se transportuje u ćeliju na taj način. Halofite imaju malo drugačije građene membrane nego glikofite, čime je olakšana kontrola transporta  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ .

Kod vaskularnih biljaka održavanje jonske homeostaze se odigrava uz pomoć vakuolarnih protonskih pumpi. Na tonoplastu se nalaze dve vrste  $\text{H}^+$ -ATP-aza: vakuolarna protonska V-ATP-aza i vakuolarna pirofosfataza V-PP-aza. V-ATP-aza je najzastupljenija pumpa u biljnim ćelijama. U uslovima stresa, preživljavanje biljaka zavisi od aktivnosti V-ATP-aze (Dietz *et al.* 2001). Prema dosadašnjim podacima utvrđeno je da se aktivnost ove pumpe povećava u stresu izazvanom solima (Gupta & Huang 2014).

Uloga SOS signalnog puta (eng. Salt Overly Sensitive) u održavanju jonske homeostaze i tolerancije na stres izazvan solima je dobro opisana kod vaskularnih biljaka i smatra se da je ovaj put osnova u reakciji biljaka na povećan salinitet. SOS signalni put (Slika 7) je ključan za efluks jona  $\text{Na}^+$  preko  $\text{Na}^+$ -ATP-aze i  $\text{H}^+$ -ATP-aze, a za povećanje influksa jona  $\text{K}^+$ . SOS signalni put se sastoji iz tri glavna proteina: SOS1, SOS2 i SOS3 (Gupta & Huang 2014). Gen *SOS1* kodira za antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , koji je esencijalan u regulaciji efluksa  $\text{Na}^+$  iz ćelija. Međutim, ovaj transporter učestvuje i u izbacivanju  $\text{Na}^+$  iz ksilema u okolna tkiva kod vaskularnih biljaka. *SOS2* gen kodira za serin/treonin kinazu koja se aktivira putem  $\text{Ca}^{2+}$  u intenzivnom stresu solima. *SOS3* gen kodira za  $\text{Ca}^{2+}$  vezujući protein. Usled povećanja koncentracije  $\text{Na}^+$  u ćeliji dolazi do naglog povećanja  $\text{Ca}^{2+}$  u citoplazmi čime se aktivira SOS2. SOS2 protein se vezuje za SOS3 protein i formira se SOS2-SOS3 kompleks koji predstavlja aktiviranu kinazu. Kompleks putuje do plazmaleme i fosforiliše SOS1 čime se povećava efluks  $\text{Na}^+$  i smanjuje toksičnost u ćeliji. Aktivnost SOS1 ne zavisi samo od SOS2-SOS3 kompleksa, već on može biti fosforilisan od strane fosfolipaze D (PLD) (Yu *et al.* 2010). Pored ove tri glavne komponente SOS signalnog puta, postoje i SOS4 i SOS5, koje učestvuju u održavanju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  homeostaze preko aktiviranja mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAP kinaza).



Slika 7. Šema SOS signalnog puta (Modifikovano prema publikaciji Gupta & Huang 2014).

Iako je SOS put dobro opisan, percepcija signala stresa je nepoznata. Problem je u identifikovanju receptorskog jedinjenja, ali i nekoliko prvih komponenti signalnog puta. Predlog senzornog molekula za  $\text{Na}^+$  je C-terminalni domen SOS1 proteina (Shabala *et al.* 2005), ali glavni



dokazi za ovo nedostaju. Takođe, moguć predlog je i SOS5 protein. On je pozicioniran sa spoljašnje strane plazmaleme, pa je stoga predložen kao senzor ekstracelularnog  $\text{Na}^+$  (Mahajan *et al.* 2008). Pretpostavlja se da ROS i ciklični nukleotidi, kao što je ciklični guanozin monofosfat (cGMP) učestvuju u signalnom putu stresa izazvanog povećanim salinitetom (Gupta & Huang 2014).

Kod briofita je potvrđeno prisustvo puta sličnog kao što je opisani SOS signalni put. Iako se manje zna o komponentama koje učestvuju u mehanizmima održavanja jonske homeostaze kod briofita, poznato je da postoje membranski transporteri homologe SOS1 iz *Arabidopsis*-a kod *P. patens* kao što su  $\text{Na}^+$ -ATP-aze PpENA1 i PpENA2 (lat. *Physcomitrella patens* Exitus Natru) (Lunde *et al.* 2007; Fraile-Escanciano *et al.* 2010; Drew *et al.* 2011). S obzirom na funkciju ovih transportera, može se pretpostaviti da *P. patens* ima komponente SOS signalnog puta, ali one nisu sve identifikovane. Značajno je to da se PpENA1 aktivira isključivo usled povećanog saliniteta i da je njegova aktivnost 2-5 puta veća kod briofita nego  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportera kod vaskularnih biljaka (Lunde *et al.* 2007).

Pored ovog transportera, zastupljene su i vakuolarna  $\text{H}^+$ -ATP-aza PpSHP1 i PpSHP2 (eng. *Physcomitrella patens* Small Hydrophobic Protein), jonski kanali za  $\text{Cl}^-$  i ABC transporteri (eng. ATP-Binding Cassete) (Wang *et al.* 2008a). Geni *PpSHP1* i *PpSHP2* su homologe gena *RC11* i *RC12* (eng. Rare Cold Inducible 1 i 2) *A. thaliana*. Njihova ekspresija se povećava u uslovima dehidracije i egzogene ABA, ali ne i salinitetom kod *A. thaliana*, što je zanimljivo, jer homologe ovih gena kod *P. patens* bivaju aktivirani hladnim stresom, egzogenom abscisinskom kiselinom, salinitetom, osmotskim stresom i dehidracijom (Kroemer *et al.* 2004).

Fototropin je receptor plave svetlosti koji učestvuje u fototropnim reakcijama kod biljaka i pokretima stoma, ali kod *P. patens* on reguliše rad protonske pumpe na plazmali i tako učestvuje u održavanju jonske homeostaze (Wang *et al.* 2008b). Utvrđeno je da je  $\text{Na}^+$ -ATP-aza, koja je ključna za toleranciju dehidracije i povećanog saliniteta kod briofita, bila prisutna kod prvih kopnenih biljaka, ali se kasnije u toku evolucije izgubila kod cvetnica (Kroemer *et al.* 2004; Wang *et al.* 2008a). Za razliku od aktivne regulacije jona  $\text{Na}^+$ , usvajanje  $\text{Cl}^-$  je ograničeno „down“-regulacijom kod briofita, što se ispoljava kroz smanjeno usvajanje jona hlora (Wang *et al.* 2008b). ABC transporteri učestvuju u regulisanju homeostaze verovatno tako što ograničavaju akumulaciju jona u citoplazmi, aktivno ih pumpajući u vakuolu. Naravno, svi navedeni mehanizmi se odnose isključivo na model vrstu *P. patens* i treba biti obazriv sa interpretacijom mehanizama kod drugih vrsta, posebno halofitnih briofita.

### **3.1.2.2. Sintaza kompatibilnih rastvora**

Prilikom stresa izazvanog solima biljke sintetišu i akumuliraju kompatibilne rastvorke – osmolite. Ova jedinjenja ne učestvuju u metabolizmu ćelije i ne ometaju enzimske reakcije, prvenstveno zbog svoje neutralnosti. U ovu grupu jedinjenja se ubrajaju šećeri, šećerni alkoholi, polioli, tercijarna i kvaternarna amonijumova jedinjenja, amino kiseline i sumporna jedinjenja (Rhodes & Hanson 1993). Svi osmoliti imaju nekoliko zajedničkih osobina: rastvorljiva su jedinjenja, male molekulske mase, nenaelektrisana i nisu toksična za ćeliju ni u veoma visokim koncentracijama. Kompatibilni rastvorci se sintetišu u citoplazmi i organelama, a njihovu sintezu pokreću MAP kinaze, koje prenose signal stresa do jedra, gde dolazi do ekspresije gena za sintezu osmolita.

Glavna uloga osmolita je snižavanje osmotskog potencijala u cilju održavanja turgora i vodnog balansa ćelije. Osmoliti mogu delovati individualno ili kombinovano. Njihova najznačajnija funkcija je stabilizacija makromolekula tako što povećavaju termodinamičku stabilnost proteina vezivanjem vodonika, što za razliku od hidrofobnih interakcija ne utiče na ćelijsko funkcionisanje tokom stresa.

Osmoliti imaju ulogu u suzbijanju produkcije ROS, tako što se ponašaju kao skevendžeri radikala ili tako što štite antioksidativne enzime (Hare *et al.* 1998). Kod biljaka se kao glavni osmoliti sintetišu prolin (Pro) i glicin betain (GB), dok su kod briofita najznačajniji osmoliti rastvorljivi šećeri, prvenstveno saharoza. Bitno je napomenuti da biljke ne sintetišu osmolite u većoj koncentraciji u svakom momentu, već isključivo kada su izložene nekom abiotičkom stresu. Sinteza ovih supstanci je energetska zahtevan proces, troši se dosta ATP, pa biljka uvek mora da bira aspekt u koji je isplativije ulagati energiju tokom stresa.

Koncentracija kompatibilnih rastvora se održava u ćeliji ireverzibilnom sintezom ili kombinacijom sinteze i degradacije (Gupta & Huang 2014). Amino kiseline cistein, arginin i metionin opadaju usled povećanog saliniteta kod vaskularnih biljaka, dok koncentracija prolina značajno raste (El-Shintinawy & El-Shourbagy 2001). Pored toga što pruža toleranciju na stres, Pro služi i kao organska rezerva azota koji je potreban biljci tokom oporavka od stresa. GB povećava osmolarnost ćelije i štiti ćeliju putem osmotskog prilagođavanja (Gadallah 1999), stabilizuje proteine (Mäkelä *et al.* 2000), štiti fotosintetički aparat i uklanja ROS (Ashraf & Foolad 2007). Polioli i šećerni alkoholi (manitol i sorbitol) su osmoliti i funkcionišu kao šaperoni, uklanjaju ROS. Šećeri kao što su glukoza, fruktoza, fruktani, trehaloza i skrob su veoma zastupljena komponenta u osmotskom prilagođavanju kod vaskularnih biljaka. Utvrđeno je da salinitet povećava nivo redukujućih šećera (saharoze i fruktana) u ćeliji mnogobrojnih biljaka. Nivoi šećera mogu opadati ili rasti tokom izloženosti stresu, a to zavisi od genotipa, vrste, intenziteta i trajanja stresa (Gupta & Huang 2014).

Uobičajeni odgovor briofita otpornih na desikaciju je povećanje nivoa rastvorljivih šećera kao što je saharoza (Smirnoff 1992; Oliver *et al.* 2005). Specifično, briofite teže da smanje nivo redukujućih šećera (glukoza i fruktoza) tokom desikacije (Smirnoff 1992; Oliver *et al.* 2005). Trehaloza je šećer koji se ne sintetiše često kod velikog broja vaskularnih biljaka, ali ni briofita. Međutim, vodni deficit i stres izazvan solima indukuju povećanu akumulaciju ovog šećera u *in vitro* uslovima kod nekoliko vrsta mahovina (Stewart & Larher 1980). Metaboličke studije na *P. patens* ukazuju da se sintetišu i akumuliraju monosaharidi (glukoza, fruktoza i altroza) i disaharidi (maltoza i izomaltoza) tokom suše (Erxleben *et al.* 2012). Raznovrsni šećeri su prisutni u gametoforima i protonemi u optimalnim uslovima, a zanimljivo je to da se profil šećera u ova dva tkiva kvalitativno i kvantitativno razlikuje. Drugi ugljeni hidrati dokumentovani kod briofita su rafinoza, sorbitol i manitol (Oliver *et al.* 2005). Maltitol se specifično nalazi kod *P. patens* (Erxleben *et al.* 2012), dok se galaktinol (prekursor za sintezu rafinoznih šećera) nalazi izuzetno kod *Polytrichum alpinum* tokom desikacije (Zúñiga-González *et al.* 2016), mada je pronađeno da kod *P. patens* učestvuje u zaštiti ćelija od oksidativnih oštećenja (Erxleben *et al.* 2012). Evidentno je da se rastvorljivi ugljeni hidrati se koriste od strane halofitnih briofita u osmotskom prilagođavanju, ali i za zaštitu od oksidativnog stresa. Šećeri se ponašaju kao osmoprotektanti i interaguju sa membranskim fosfolipidima. Pored toga učestvuju kao primarni glasnici u signalnog transdukciji (Yuanyuan *et al.* 2009).

Vrsta briofite, tip i intenzitet stresa utiču na ukupni sadržaj osmolita. Generalno, pored fruktoze, saharoze i glukoze, briofite akumuliraju fruktozide (Chopra & Kumra 1988), ali i neke *species*-specifične šećere i šećerne alkohole, kao što je fruktooligosaharid 1-kestoza kod *Rhodobryum ontariense* (Pejin *et al.* 2012a, 2012b; Klavina 2014). Trisaharidi su veoma retko dokumentovani kod biljaka generalno, ali se čini da kod briofita kestoza proizvodi drugačije efekte u poređenju sa šećerima akumuliranim kod vaskularnih biljaka, pa stoga može biti veoma korisna u stresnim uslovima (Ćosić *et al.* 2019). Potvrđeno je da ukupan sadržaj šećera varira kod različitih vrsta ispitivanih brio-halofita, ali i to da upravo ta raznolikost doprinosi značajnoj rezistenciji na stres (Vujičić *et al.* 2015, 2016).

Briofite su generalno bogate u pogledu metabolita koje sintetišu i akumuliraju (Krzaczkowski *et al.* 2008), mada postoje značajne razlike između glavnih grupa briofita, posebno mahovina i jetrenjača. Kod mahovina moguće je izolovati saharozu, fruktozu i glukozu iz bilo kog dela tela (Klavina 2014), dok je prisustvo poliola kao što su manitol, sorbitol i volemitol karakteristično za jetrenjače (Marschall & Laufer 2002). Sa druge strane, prisustvo prolina kod halofitnih briofita nije dokumentovano u naučnim radovima (Goffinet & Shaw 2009). Smatra se da je akumulacija prolina alternativa akumulaciji šećera u stresu (Takagi 2008). Produkcija prolina je veoma jak indikator odgovora na sušu kod vaskularnih biljaka, dok se šećeri češće akumuliraju kada je pitanju sinergističko dejstvo dva ili više abiotičkih faktora, tj. kada je u pitanju stresni sindrom. Međutim, prolin je moguće detektovati kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii*. Vujičić (2016) je ukazao na postojanje prolina kod navedenih vrsta nakon izlaganja biljaka kratkom stresu tokom 3 dana i dugom stresu tokom 21 dan. U svakoj postavci je bilo moguće detektovati prolin, a njegova koncentracija je rasla sa povećanjem intenziteta stresa u kratkom stresu, dok je dugotrajniji stres uzrokovao značajno smanjenje koncentracije prolina u ćelijama. Pored toga, sličan trend je pokazan i za odnos prolina i slobodnih amino kiselina (Vujičić 2016). Ovakvi rezultati su u skladu sa tvrdnjom da Pro povećava sposobnost preživljavanja stresa izazvanog solima, jer uzrokuje regulaciju, kompartmenzaciju i produktivnost (Bohnert & Shen 1999). Iako je GB najčešće akumulirano jedinjenje kod traheofita prilikom dehidracije, njegovo prisustvo nije dokumentovano kod mahovina (Wood & Oliver 2004).

### 3.1.2.3. Sinteza zaštitnih proteina

Zaštitni proteini koji se najčešće sintetišu prilikom stresa izazvanog solima kod biljaka su: akvaporini, šaperoni, enzimi za sintezu osmolita i enzimi i jedinjenja za detoksifikaciju ROS i LEA (eng. Late Embryogenesis Abundant) proteini (Bray 1997).

Ukoliko se briofite izlože vodnom deficitu, najuobičajeniji odgovor je regulacija ekspresije *LEA* gena i sinteza *LEA* proteina. *LEA* proteini imaju širok spektar funkcija, a tokom stresa izazvanog solima najintenzivnija je ekspresija gena za grupu II i III *LEA* proteina (Wang *et al.* 2008a). Ekspresija *LEA* gena se dešava isključivo u stresnim uslovima. Tolerancija na desikaciju je odlika nekih mahovina i verovatno je posledica efikasnog sistema za reparaciju oštećenja nastalih u stresu, kada se biljke ponovo nađu u povoljnim uslovima. Za to su zaslužni dehidrini (DHNs), koji pripadaju grupi II *LEA* proteina. Glavni dehidrini koji su dokumentovani kod *P. patens* tokom stresa izazvanog solima i osmotskog stresa su PpDHNA i PpDHNB (eng. *Physcomitrella patens* Dehydrine A; Dehydrine B) (Saavedra *et al.* 2006; Ruibal *et al.* 2013). Ekspresija ovih gena je kontrolisana dehidracijom, povećanom koncentracijom soli i osmotskim stresom, ali i egzogeno dodatom apscisionskom kiselinom. Pored navedenih dehidrina, poznati su i PpDHNC i PpDHND kod *P. patens*, ali oni znatno manje doprinose toleranciji na stres izazvan solima nego PpDHNA (Ruibal *et al.* 2013). Dehidrini su lokalizovani u citoplazmi i akumuliraju se blizu membrane tokom stresa kako bi mogli da reaguju veoma brzo kao šaperoni koji čuvaju enzimsku aktivnost ili kao skevendžeri slobodnih radikala, ali i kao stabilizatori membrana (Goyal *et al.* 2005). PpDHNA i PpDHNB su lokalizovani u citoplazmi, mada se PpDHNA može detektovati i u plazmalemi. Među brojnih biohemijskim aktivnostima koje se pripisuju dehidrinima, jedna je i funkcija stabilizacije membrana ili proteina (Close 1997), uklanjanje slobodnih radikala, zaštita lipida od peroksidacije (Hara *et al.* 2003) i prevencija agregacije enzima usled stresa (Kovacs *et al.* 2008). Povećana sinteza dehidrina se detektuje usled primene ABA, manitola i NaCl.

Pod uticajem stresa izazvanog solima kod *P. patens* su identifikovani geni koji kodiraju za regulatorne proteine, kao što je kalmodulin, kalcijum vezujući protein (Takezawa & Minami 2004) i

PII tip kalcijumove ATP-aze (Qudeimat *et al.* 2008) i AP2/EREBP transkripcioni faktor (eng. Apetala2/Ethylene Responsive Element Binding Proteins) kod *P. patens* poznat kao PpDBF1, koji je homolog DREB responsivnim elementima (eng. Dehydration Responsive Element Binding) (Liu *et al.* 2007). Ovaj transkripcioni faktor se aktivira u prisustvu povećane koncentracije soli, ali i drugim stresorima koji izazivaju dehidraciju ćelija, pa stoga ima ključnu ulogu kod briofita, kao što DREB ima kod vaskularnih biljaka (Liu *et al.* 1998).

Sinteza proteina toplotnog stresa, HS proteina (eng. Heat Shock Proteins) se događa prilikom izlaganja biljaka različitim tipovima stresova, ne samo tokom stresa visokim temperaturama. HS proteini funkcionišu kao šaperoni koji prepoznaju proteine nepravilne konformacije i stabilizuju ih i štite od denaturacije. Drugi HS proteini koriste energiju ATP da denaturišu agregate i povrate nativnu konformaciju proteina koji su bili pod zaštitom (Hinault *et al.* 2006). Uobičajeni HS proteini kod biljaka pripadaju HSP70 familiji. Takođe, mali HS proteini („small Heat Shock Proteins“ - sHSP) su specifična grupa sa ključnom ulogom u toleranciji na stres kod briofita. Biljke akumuliraju male HS proteine prilikom odgovora na stres visokih temperatura, suše, povećane koncentracije soli i oksidativni stres, ali i prilikom delovanja fitohormona ABA i salicilne kiseline (SA) (Ruibal *et al.* 2013). Kod *P. patens* se tokom stresa izazvanog solima i osmotskog stresa akumuliraju mali HS proteini u citoplazmi koji su kodirani genom *PpHsp16.4* (Ruibal *et al.* 2013). Pretpostavlja se da produkti ovih gena učestvuju u funkcionisanju hloroplasta, s obzirom na to da su lokalizovani u blizini ovih organela. Prisustvo i akumulacija HS proteina tokom stresa je potvrđena kod mahovina koje su izlagane dehidraciji i visokim i niskim temperaturama (Saidi *et al.* 2009; Liu *et al.* 2014). Učešće ovih proteina tokom stresa solima se može pretpostaviti kod briofita, ali su potrebna detaljnija i opsežna istraživanja.

U zaštitne proteine se ubraja i enzimska komponenta zaštite od oksidativnog stresa, koja je detaljno opisana u sledećem poglavlju.

#### **3.1.2.4. Zaštita od oksidativnog stresa**

Molekuli koji čine antioksidativni sistem mogu biti hidrofilni i hidrofobni, odnosno, mogu delovati i u vodenoj i u lipidnoj sredini. Prisustvo antioksidativnog sistema je potvrđeno kod briofita, ali mehanizmi antioksidativne zaštite nisu detaljno proučeni kao kod vaskularnih biljaka. Međutim, poznato je da ovaj sistem obuhvata i enzimske i neenzimske komponente, pri čemu enzimsku komponentu svrstavamo u klasu zaštitnih proteina, čija je sinteza i aktivnost značajno povećana u uslovima stresa. Antioksidativni enzimi često koriste neenzimsku komponentu kao donore elektrona za njihovu aktivnost.

Enzimske komponente antioksidativnog sistema zaštite obuhvataju antioksidativne enzime kao što su: superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), peroksidaze (POX) (Mittler 2002), askorbat peroksidaze (APX), monodehidroaskorbat-reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR) i glutation reduktaza (GR) (Noctor & Foyer 1998). Kod briofita se od enzimskih komponenti sintetišu SOD, CAT, POX, citohrom P450-mono oksigenaza, 2-Cys peroksiredoksin i peroksiredoksin (Wang *et al.* 2008a), ali i nabrojani enzimi askorbat-glutationskog ciklusa, čija je aktivnost podstaknuta vodnim deficitom (França *et al.* 2007).

SOD enzimi generalno predstavljaju prvu liniju odbrane od oksidativnog stresa kod biljaka. Njihova funkcija je uklanjanje superoksid anjon radikala u ćelijama prevodeći ga u vodonik peroksid i molekularni kiseonik. SOD se mogu podeliti u tri grupe u zavisnosti od toga koji metal koriste kao

kofaktor: Fe-SOD, Mn-SOD i Cu/Zn SOD. SOD katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala do vodonik peroksida i molekuskog kiseonika. Cu/Zn SOD se sreću u citoplazmi i hloroplastima kod biljaka, dok je Fe-SOD karakterističan za hloroplaste, a Mn-SOD za mitohondrije (Stikić & Jovanović 2012). Kod nekih vrsta briofita otpornih na stres dokumentovano je povećanje aktivnosti enzima SOD, APX i monodehidroaskorbata (MDA) (Hooijmaijers 2008). Protein sličan greminu (eng. gremin-like protein) ima Mn-SOD aktivnost kod vrste *Barbula unguiculata* tokom izlaganje stresu izazvanom solima (Nakata *et al.* 2004). Gen koji kodira za ovaj protein *GLP* je identifikovan kod *P. patens* (Nakata *et al.* 2004) i njegova transkripcija je povećana u uslovima stresa izazvnog solima. POX imaju široku supstratnu specifičnost i vrše uklanjanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iz citoplazme i hloroplasta kao odgovor na mehaničke povrede, oksidaciju ćelijskih komponenti, sintezu ćelijskog zida, odbranu od napada patogena, sintezu etilena (Milošević 2010). CAT je stabilan enzim koji ne zahteva specifičnu aktivaciju i ima visoku efikasnost. Operativan je u peroksizomima i katalizuje reakciju razgradnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na vodu i molekulski kiseonik.

Kod ispitivanih vrsta mahovina *P. patens*, *A. undulatum* i jetrenjače *M. polymorpha*, Vujičić i saradnici (2017) su ukazali da je enzimska komponenta koja čini POX, SOD i CAT verovatno prvi nivo antioksidativne odbrane, dok neenzimska komponenta koju većinski čine fenolna jedinjenja čini drugi nivo odbrane od oksidativnog stresa. Aktivnost antioksidativnih enzima se povećava kod navedenih vrsta briofita usled dodavanja niskih koncentracije ABA, dok visoke koncentracije ABA nisu dovele do značajnih promena u aktivnosti antioksidativnih enzima (Vujičić *et al.* 2017). Ovakvi rezultati potvrđuju učešće ABA u signalnom putu stresa kod briofita, a pretpostavljaju da je ABA ključni fitohormon na prvoj liniji odbrane od abiotičkog i oksidativnog stresa kod briofita. Pored ABA, dužina izlaganja stresu izazvanom solima takođe igra bitnu ulogu za aktivnost enzima. Kratkotrajni stres ne dovodi do značajnih promena u aktivnosti ukupnih POX i CAT kod ispitivanih vrsta, dok dugotrajni stres dovodi do pada aktivnosti POX i CAT na sličan način (Vujičić 2016). Zanimljivo je da halofitne vrste *E. hungaricus* i *H. heimii* pokazuju povećanu aktivnost ovih enzima na umerenim koncentracijama soli, što ukazuje na njihovu adaptiranost na prisustvo soli čak i po pitanju antioksidativne zaštite. Značajno je napomenuti da su dominantne izoforme peroksidaze POX1 i POX3 kod *P. patens*, ali da visoke koncentracije soli uslovljavaju aktivnost POX2. Kod vrste *E. hungaricus* je POX 2 aktiviran već na nižim koncentracijama, dok kod *H. heimii* aktivnost POX2 nije zabeležena (Vujičić 2016). Aktivnost katalaza je slična kao i peroksidaza. Kod *P. patens* je zabeležena samo jedna izoforma CAT - CAT1. Vrsta *E. hungaricus* se odlikuje postojanjem sve tri forme CAT1, 2 i 3, dok *H. heimii* ne poseduje CAT3. Za razliku od POX i CAT, enzimska aktivnost SOD je povećana i kod biljaka u kratkotrajnom stresu. Dugotrajni stres, međutim, uslovljava pad aktivnosti SOD kod *P. patens*, dok se kod halofta aktivnost SOD povećava. Kod ispitivanih vrsta je potvrđeno postojanje četiri izoforme SOD: Mn-SOD, Zn/Cu SOD1, Zn/Cu SOD2 i Fe-SOD. Kod *P. patens* je najzastupljenija Mn-SOD, a najmanje Zn/Cu SOD1 izoforma. Kod *E. hungaricus* se može dokumentovati još jedna izoforma Zn/Cu SOD3, sa relativno podjednakom zastupljenošću svih SOD enzima. Ova vrsta je ima najveću raznovrsnost enzimske komponente. Za razliku od nje, *H. heimii* poseduje samo tri forme SOD, Fe-SOD, Zn/Cu SOD1 i Mn-SOD, ali su sve forme relativno podjednako zastupljene, osim toga da Mn-SOD nije zabeležen kod kontrolnih biljaka (Vujičić 2016).

Enzimi askorbat-glutationskog ciklusa su značajni za uklanjanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod briofita, posebno APX. Pri toj reakciji ovaj enzim koristi elektrone od askorbata, koji se oksiduje u hloroplastima do dehidroaskorbata. Redukcija askorbata se vrši pomoću enzima MDHA reduktaze ili DHA reduktaze uz korišćenje energije iz NADPH (Redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat). Kod mahovine *Brachythecium velutinum* i jetrenjače *M. polymorpha*, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se uklanja askorbatskim sistemom korišćenjem enzima APX (Paciolla & Tommasi 2003).

Glutation peroksidaze (GPX) takođe učestvuje u uklanjanju  $H_2O_2$  razlažući ga na vodu i molekularni kiseonik, ali i lipidnih peroksida nastalih u membranama. GPX kao donor elektrona koristi glutation, koji se naknadno redukuje uz pomog glutation reduktaze (GR) koja koristi NADPH kao donor elektrona.

Smatra se da je antioksidativni kapacitet često veći kod briofita nego kod vaskularnih biljaka (Aslanbaba *et al.* 2017). Međutim, postoje značajne razlike u antioksidativnom potencijalu između do sada ispitivanih vrsta briofita. Chobot *et al.* (2008) su ukazali na razliku između četiri ispitivane vrste mahovina na prisustvo ROS i RNS. Korišćenje različitih antioksidativnih metoda izdvojilo je vrste *A. undulatum* i *P. formosum* kao vrste sa veoma jakim antioksidativnim kapacitetom, za razliku od *Thuidium tamariscinum* i *Pleurozium schreberi*.

### 3.1.3. Signalni put stresa izazvanog solima

Veoma je važno da biljke odreaguju brzo po nastupanju nepovoljnih uslova, pa se transkripcija i ekspresija gena ključnih u odbrani od stresa dešava veoma brzo. Pretpostavlja se da se stres izazvan solima prepoznaje na nivou plazmaleme, a da se potom signal prenosi u citoplazmu ćelije, gde se povećava koncentracija sekundarnog glasnika, jona  $Ca^{2+}$ . Primarni signalni molekuli stresa kod briofita su fototropin i 14-3-3 protein (Wu *et al.* 1997; Takemiya *et al.* 2005), koji regulišu  $H^+$ -ATP-aze. Kalcijum je ključan sekundarni glasnik u adekvatnom odgovoru biljaka na abiotički stres (Sanders *et al.* 2002; Scarse-Field & Knight 2003). Povećanje nivoa intraćelijskog  $Ca^{2+}$  dovodi do povećanja  $Ca^{2+}$ -zavisnih protein kinaza (CDPK) i kalcineurinu B sličnih proteina (eng. Calcineurin B-like), koji učestvuju u signalnom putu stresa izazvanog solima kod briofita. Novi membranski kalmodulin vezujući proteini - MCamb1 i MCamb2 (eng. Membrane Calmoduline binding 1; 2) su proteini identifikovani kod *P. patens*, pa se pretpostavlja da igraju bitnu ulogu u transdukciji signala stresa. Ekspresija navedenih gena je indukovana povećanom koncentracijom soli, pa se ovakvi geni nazivaju „salt-inducible“ (Takezawa & Minami 2004). Pretpostavlja se da se u ovom signalnom putu kalcijumove pumpe aktiviraju uz pomoć ATP i da one učestvuju u snadbjevanju energije u toku stresa izazvanog solima kod biljaka (Qudeimat *et al.* 2008). Inducibilni gen *PCAI* (eng. *Physcomitrella*  $Ca^{2+}$ -ATPase) kod *P. patens* kodira za  $Ca^{2+}$ -ATP-azu, koja se aktivira u toku dehidratacije, egzogeno dodatog NaCl i tretmana apscisionskom kiselinom. Produkt gena je PIIB tip  $Ca^{2+}$ -ATP-aza pozicionirana na tonoplastu. Ovaj protein igra ključnu ulogu u signalnom putu i toleranciji na stres izazvan solima (Qudeimat *et al.* 2008). Kao i kod drugih biljaka, glavni činioci signalne kaskade su protein kinaze, a najčešće su to kinaze bazirane na mijelinu, kao što je dokumentovano kod *F. hygrometrica* (D'Souza & Johri 2002). Ove kinaze spadaju u protein kinaze aktivirane stresom ili „salt-induced protein kinases“.

Mnoge komponente signalnog puta stresa kod briofita nisu poznate i opisane, ali principi percepcije i transdukcije su generalno jasni. Celokupni proces transdukcije signala dovodi do promena u ekspresiji gena responsivnih na stres (Wang *et al.* 2012). Ovi geni igraju ključnu ulogu u odgovoru na abiotički stres i toleranciju na stres izazvan solima, a neki od njih su odgovorni i za sintezu ABA. Signalna transdukcija se može dogoditi i preko ABA-signalnog puta, odnosno, biti ABA-zavisna. U tom slučaju, rezultat signalne kaskade je pokretanje ekspresije gena čija se ekspresija indukuje putem ABA (eng. ABA-responsive gena). Veliki broj ABA-responsivnih gena su ujedno i „salt-inducible“, što znači da se ova dva puta u velikom broju koraka preklapaju i usložnjavaju odgovor biljaka na povećanu koncentraciju soli. Preklapanje signalnih puteva ABA i abiotičkog stresa kod biljaka je barem delimično posredovano apscisionskom kiselinom (Ishitani *et al.* 1997). Generalno, u poređenju sa

cvetnicama, malo se zna o funkcionisanju fitohormona u uslovima stresa kod briofita (Ćosić *et al.* 2019).

Kao što je već napomenuto, ekspresija gena u stresnim uslovima omogućava toleranciju na stres izazvan solima. Upravo su odgovori na molekularnom nivou ti koji su ključni za toleranciju kod biljaka. U stresu se veoma precizno reguliše ekspresije gena za sve proteine i enzime koji učestvuju u formiranju odgovora na stres izazvan solima.

## **1.8. Neenzimske komponente briofita u odgovoru na oksidativni stres i sekundarni metaboliti briofita**

Smatra se da su briofite su generalno dobro adaptirane na oksidativni stres zbog postojanja različitih antioksidativnih mehanizama zaštite (Nagae *et al.* 2008). Neenzimske komponente ili antioksidansi zastupljeni kod briofita obuhvataju: askorbinsku kiselinu, tokoferol, karotenoide, lipoičnu kiselinu, fenolna jedinjenja, šećere, šećerne alkohole i prolin (Sharma *et al.* 2015). Briofite generalno proizvode različita biološki aktivna jedinjenja, kao što su fenoli, bibenzili, mono-, di-, tri- i seskviterpeni, flavonoidi i dihidrostilbeni (Asakawa 2007; Ludwiczuk & Asakawa 2019; Sabovljević *et al.* 2017).

Askorbinska kiselina ili vitamin C je jedan od najjačih antioksidanasa koji se sintetise u biljnim ćelijama. Direktno reaguje sa slobodnim radikalima, ali može služiti i kao donor elektrona za enzim APX, koji uklanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pored toga, donor je elektrona i kofaktor za violaksantin deepoksidazu, enzim ksantofilnog ciklusa, pa tako posredno učestvuje u termalnom rasipanju energije i rasterećenju redukovano oblika NADPH (Stikić & Jovanović 2012).

Prolin je veoma zastupljen kod traheofita i čini ključnu komponentu u osmotskom prilagođavanju biljaka i odbrani od vodnog deficita, kao što je već napomenuto. Prolin se sintetise uglavnom od glutamata, ali prekursor može biti i ornitin. Iako je glavna uloga prolina regulacija citoplazmatske acidoze i održavanje odnosa NADP<sup>+</sup>/NADPH, on posredno učestvuje u zaštiti proteina od oksidacije i generalno zaštiti od osmotskog i oksidativnog stresa.

Tokoferol ili vitamin E se smatra značajnom neenzimskom komponentom kod biljaka. On se sastoji od četiri tokoferola i četiri tokotrienola rastvorljivih u mastima. Ustanovljeno je da se kod biljaka tokoferoli i tokotrienoli javljaju u tri oblika ( $\alpha$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ -tokoferol). Hidroksilna grupa u strukturi im omogućava da budu donori vodonikovog atoma kako bi smanjili koncentraciju slobodnih radikala u ćelijama. Utvrđeno je da se kod biljaka usled različitih abiotičkih stresora menja nivo  $\alpha$ -tokoferola, najaktivnijeg oblika kod biljaka (Munné-Bosch 2005).  $\alpha$ -tokoferol je lokalizovan u membrani hloroplasta i tilakoidnim membranama u kojima na efikasan način deaktivira ROS (prvenstveno <sup>1</sup>O<sub>2</sub> i <sup>•</sup>OH) koji nastaju u fotosintezi i tako sprečava lipidnu peroksidaciju tilakoidnih membrana. Tokoferol se javlja u više različitih formi i kod briofita, ali  $\delta$ -tokoferol nije identifikovan kod do sada ispitivanih vrsta mahovina (Vujičić 2016). Usled kratkotrajnog stresa koncentracija  $\alpha$ -tokoferola i  $\gamma$ -tokoferola raste kod svih ispitivanih vrsta, a najviše vrednosti ukupnih tokoferola su zabeležene kod halofite *H. heimii* (Vujičić 2016).

Pored nabrojanih, askorbat i glutation su značajne neenzimske komponente čija je primarna uloga u askorbat-glutationskom ciklusu već pomenuta. Takođe, pomoćni fotosintetički pigmenti –

karotenoidi značajno doprinose održavanju ravnoteže između formiranih i uklonjenih slobodnih radikala, u najvećoj meri kroz ksantofilni ciklus.

Fenolna jedinjenja su veoma raznovrsna kod mahovina, ali njihova uloga nije u potpunosti poznata (Chobot *et al.* 2006; Asakawa *et al.* 2009). Fenoli su sekundarni metaboliti biljaka, a svoje antioksidativne funkcije mogu ispoljavati na različite načine. Prema Sgherri *et al.* (2003), fenoli služe kao primarni donori elektrona za vakuolarne peroksidaze i na taj način doprinose uklanjanju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pored toga, oni mogu biti aktivatori antioksidativnih enzima, helirajući agensi i stabilizatori slobodnih radikala. Sastav i količina fenola se razlikuje u zavisnosti od vrste, biljnog tkiva, uslova u kojima biljka raste i indukcije sinteze kod biljaka. U uslovima dugotrajnog stresa izazvanog solima dolazi do sinteze i akumulacije fenolnih jedinjenja kod vrste *P. patens*, ali i kod ispitivanih halofitnih vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* (Vujičić 2016). Fenoli se sintetišu u većoj koncentraciji kod biljaka koje su gajene na podlogama sa niskim ili umerenim salinitetom (Navarro *et al.* 2006). Salinitet obično uslovljava porast količine fenolnih jedinjenja, mada je smanjenje količine dokumentovano kod pojedinih vrsta (Bogdanović *et al.* 2011). Najzastupljenija fenolna jedinjenja kod briofita su iz klase flavnonoida i bibeznila (Mues & Zinsmeister 1988). Kod ispitivanih vrsta od strane Vujičić (2016) zapažena je veća raznovrsnost fenola zastupljena u kratkotrajnom stresu kod sve tri ispitivane vrste, dok je u dugotrajnom stresu dominantna p-kumarinska kiselina. Zanimljivo je da istu raznovrsnost brio-halofita *H. heimii* pokazuje i u dugotrajnom stresu, ali da generalno ima najnižu količinu fenola. Najbogatija fenolnim jedinjenjima je *P. patens*, koja nije halofita, ali toleriše povećan salinitet (Vujičić 2016).

Šećeri su velika i raznovrsna grupa primarnih metabolita biljaka. Oni su izvor energije, imaju ulogu prekursora za razna jedinjenja, mogu biti signalni molekuli i osmoliti. Šećeri takođe doprinose uklanjanju ROS i održavanju odnosa NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H, kada je enzimska komponenta uključena u odbranu od stresa izazvanog solima (Sivakumar *et al.* 2002). Razgradnjom šećera se doniraju elektroni za antioksidativne enzime. Akumulacija šećera doprinosi toleranciji i preživljavanju biljaka u stresu izazvanom niskim temperaturama, ali i prilikom vodnog deficita i stresa izazvanog solima (Balibrea *et al.* 2000; Khelil *et al.* 2007). Šećeri koji su najzastupljeniji su, kao što je već navedeno, saharoza, fruktoza i glukoza. Usled stresa izazvanog solima, kod *P. patens* dolazi do akumulacije solubilnih šećera u većoj meri nego prolina, što ukazuje na ključnu ulogu šećera u osmoregulaciji (Wang *et al.* 2003; Wang *et al.* 2008a; Vujičić 2016).

Svi navedeni mehanizmi obrane od oksidativnog stresa su već dokumentovani i opisani kod traheofita (Waškiewicz *et al.* 2013).

Pored navedenih jedinjenja za koje je poznata uloga u abiotičkom stresu, bitno je spomenuti još jednu klasu sekundarnih metabolita kod briofita koji se sintetšu u značajnoj meri – terpenoidi. Terpenoidi su najveća grupa sekundarnih metabolita, sa preko 1400 različitih jedinjenja zabeleženih kod briofita. Zanimljivo je da su neki seskviterpeni izolovani iz jetrenjača specifični samo za briofite, kao što su pinguizani, miltajlani, ventrikozani (Asakawa 2007). Ova jedinjenja nisu dokumentovana kod traheofita. Briofite su bogate u aromatičnim komponentama koje obuhvataju benzenoide, flavnoide, fenilpropanoide i derivate benzila. Veliki broj jedinjenja kod briofita pripada glikozidima, ali je značajno prisustvo masnih kiselina (Mues & Zinsmeister 1988). U poređenju sa traheofitama, briofite imaju znatno veći hemodiverzitet fenolnih jedinjenja. Za veliku raznovrsnost sekundarnih metabolita briofita zaslužno je postojanje većeg broja gena uključenih u sintezu sekundarnih metabolita nego kod vaskularnih biljaka (Rensing *et al.* 2007).

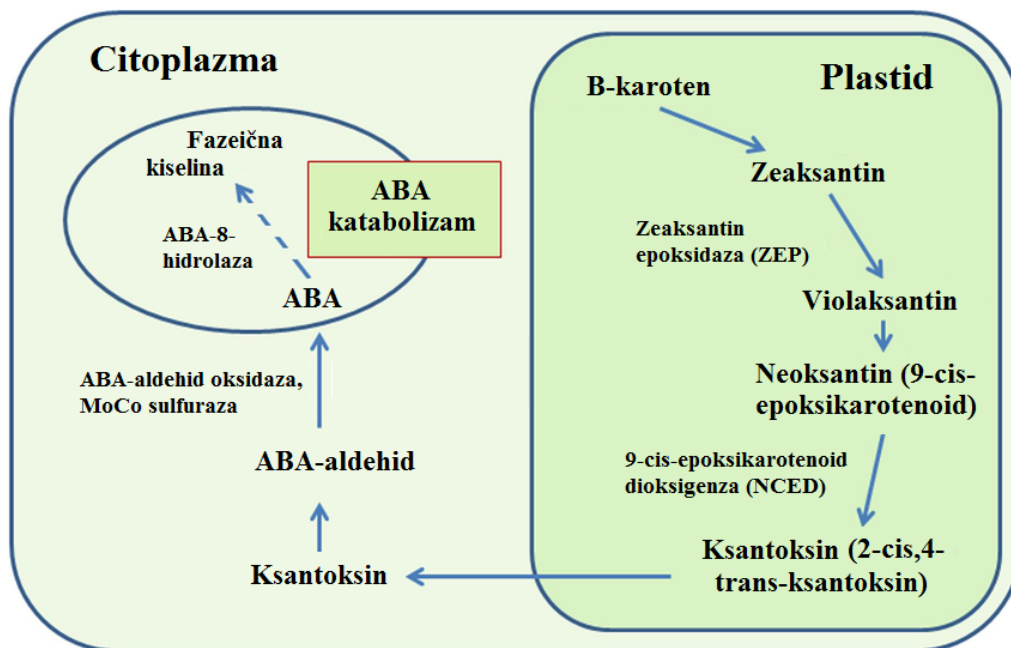


## 1.9. Uloga apscisinske kiseline u stresu izazvanom solima

Apscisinska kiselina (ABA) je jedinstveno jedinjenje prisutno kod organizama iz svih carstava. Igra ključnu ulogu u regulaciji rasteanja i razvića biljaka, kao i adaptaciji na nepovoljne uslove sredine (Sabovljević *et al.* 2014). ABA je intezivno proučavana kod traheofita, pa je poznato da visoki nivoi endogene ABA u ćelijama pospešuju sintezu rezervnih proteina u semenima, stimulišu toleranciju na desikaciju i dormanciju semena (Finkelstein *et al.* 2008), a inhibitorno deluju na klijanje semena kod semenica. Pored toga, ABA je uključena u kontrolu nastanka bočnih korenova i rasteanje klijanca kod traheofita (Xiong *et al.* 2006). Međutim, jedna od najvažnijih uloga ABA je da deluje kao signal stresnih uslova, kada je biljka izložena dejstvu ekstremnih spoljašnjih faktora, pa je njen drugi naziv „hormon suše“ (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki 2006). Brzi odgovor koji je pokrenut apscisinskom kiselinom je redukcija transpiracije kroz kontrolu otvorenosti stominog aparata (Kim *et al.* 2010), dok sporiji odgovor predstavlja podsticanje ekspresije gena koji odgovaraju na stres.

### 1.9.1. Biosinteza apscisinske kiseline

Kod vaskularnih biljaka se ABA može naći u svim tkivima biljke, ali dominantno mesto njene sinteze su ćelije sa plastidima. Pretpostavlja se da je i kod briofita isti slučaj, odnosno, da se ABA sintetiše u svim ćelijama protoneme i gametofita koje sadrže plastide. ABA pripada seskviterpenima, terpenskim jedinjenjima sa 15 ugljenikovih atoma. Njenu strukturu čini alifatični prsten sa jednom dvostrukom vezom i nezasićeni bočni lanac sa karboksilnom grupom. ABA teoretski može postojati u 4 oblika (*cis-trans* i (+)ABA/(-)ABA), ali je kod biljaka zastupljen samo (+) ABA. Međutim, samo *cis* (+) ABA je biološki aktivan oblik u biljnim ćelijama. Svi koraci biosinteze ABA se odvijaju u plastidima, osim konverzije ksantoksina u ABA, koji se dešava u citoplazmi (Seo & Koshiba 2002) (Slika 8). Šematski prikaz glavnih koraka biosinteze ABA dat je na slici 8.



Slika 8. Biosintetski put apscisinske kiseline kod biljaka. (Modifikovano prema publikaciji Sharma & Nayyar 2016).

Endogeni nivo ABA je kontrolisan katabolizmom i inaktivacijom kroz konjugaciju sa drugim molekulima. Enzimi za sintezu, modifikaciju i degradaciju ABA su poznati kod *P. patens* (Nishiyama *et al.* 2003). Analiza genoma i transkriptoma vrste *P. patens* je potvrdila postojanje biosintetskog puta ABA preko karotenoida (Rensing *et al.* 2008), kao i gena koji u njemu učestvuju, kao što je *NCED* (eng. 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) (Schwartz *et al.* 1997). Pored toga, biosinteza ABA je pozitivno regulisana (eng. up-regulated) u uslovima dehidracije i povećane koncentracije soli kod *P. patens* (Richardt *et al.* 2010). Dokumentovana je specifična aktivacija *NCED* gena u protonemi kod *P. patens* tokom osmotskog stresa i stresa izazvanog solima (Minami *et al.* 2005; Richardt *et al.* 2010), koja dovodi do povećane unutarćelijske koncentracije ABA.

Pretpostavljalo se da briofite ne sintetišu ABA, već lunularnu kiselinu. Međutim, dokumentovana je ABA kod mahovina, dok lunularna kiselina ima sličnu ulogu kao ABA kod jetrenjača (Glime 2007). Međutim, potvrđivanje prisustva ABA kod briofita i njene uloge u toleranciji na stres isušivanja i suše u vegetativnim tkivima, ukazalo je da je ABA fitohormon sa konzerviranom funkcijom kod biljaka uključujući i prve kopnene biljke.

### 1.9.2. Receptorski kompleks apscisinske kiseline

Receptori za ABA su opisani kod *A. thaliana* od strane Ma *et al.* (2009). Strukturalnim i molekularnim studijama je pokazano da srž receptorskog kompleksa ABA čine proteini PYR (pirabaktin), PYL (pirolizin) i RCAR (pirabaktin rezistentna komponenta receptora). Ostale komponente ovog kompleksa čine protein fosfataza 2C (PP2C), koja je negativan regulator i SnRK2, pozitivni regulator, koji pripada SNF-protein kinazama 2 (eng. Sucrose Non-Fermenting kinase). Oni interaguju međusobno organizujući se u dvostruki negativni regulatorni sistem [PYR/PYL/RCAR-PP2C-SnRK2] (Umezawa *et al.* 2010) i na taj način formiraju signalni kompleks ABA, tzv. ABA signalozom, koji može biti citoplazmatski i membranski (Mehrotra *et al.* 2014).

Fosforilacija i defosforilacija, koje se obavljaju posredstvom kinaza i fosfataza, omogućavaju prenos signala iz spoljašnje sredine u unutrašnjost ćelija i donose informacije o fiziološkim promenama. PP2C je glavni negativni regulator signalnog puta ABA i aktivno ispoljava negativnu regulaciju na MAP kinaze tokom suše (Danquah *et al.* 2013). SnRK2 su glavni pozitivni regulatori signalnog puta ABA i pripadaju grupi serin7treonin kinaza uključenih u odgovor biljaka na abiotički stres i u razvojnim procesima koje kontroliše ABA (Hrabak *et al.* 2003). Pored toga, SnRK2 su odgovorni za fosforilaciju transkripcionih faktora, koji aktiviraju gene odgovorne za sintezu ABA (Mehrotra *et al.* 2014). Ti transkripcioni faktori se nazivaju AREB/ABF (eng. ABRE-binding protein/ABRE-binding factor) i pripadaju klasi bZIP (eng. Basic leucine zipper), koji se vezuju za *cis*-regulatornu sekvencu u promotoru tih gena. Fosforilacija od strane protein kinaza je najčešći regulatorni mehanizam u signalnoj transdukciji i za vakuларne biljke i *P. patens* (Hardie 1999). Nakon egzogene primene ABA vrši se percepcija od strane receptora u ćelijama *P. patens*, a zatim i transdukcija signala koja vodi ka aktivaciji transkripcionih faktora i ekspresije gena.

U receptorskom kompleksu, u odsustvu ABA, PP2C inaktivira SnRK2 direktnom defosforilacijom. Kada nastupi suša, ABA se vezuje za receptor PYR/PYL/RCAR i to u udubljenju koje formiraju PYR i PYL. Ovim vezivanjem se otkriva hidrofobna površina na PYR/PYL koja poseduje visoko konzervirane sekvence, koje mogu da interaguju sa PP2C proteinima. Vezivanje PP2C proteina za ovakav kompleks pokriva aktivno mesto za fosfatazu i ponaša se kao kompetitivni inhibitor aktivnosti PP2C (Kline *et al.* 2010). Na taj način dolazi do inhibicije delovanja PP2C i SnRK2 se oslobađa negativnog dejstva i autofosforilacijom postaje aktivan (Danquah *et al.* 2013).

ABI1 (eng. Abscisic Acid Insensitive 1) i homologni ABI2 (eng. Abscisic Acid Insensitive 2) transkripcioni faktori identifikovani su kao glavni negativni regulatori signalizacije kod *Arabidopsis*-a. ABI1 i ABI2 pripadaju tzv. Grupi A u PPC2 kladi, koja obuhvata gene uključene u ABA signalizaciju. Komatsu *et al.* (2009) okarakterisali su dve varijante *PpABI1* gena kod *P. patens*, koji se eksprimiraju tokom celog životnog ciklusa mahovine i bivaju aktivirani egzogenom ABA, osmotskim stresom i stresom niskih temperatura, što ukazuje na to da se percepcija signala odvija na isti način kod briofita kao i kod vaskularnih biljaka. Posebno je ispitivan ABI3 (eng. Abscisic Acid Insensitive 3) transkripcioni faktor, ortolog *ABI3* gena kod *A. thaliana* koji kodira transkripcione regulatore (TR) neophodne za ABA-indukovanu ekspresiju gena i sticanje tolerancije na isušivanje putem diferencijacije ćelija vegetativnog tkiva (Rhode *et al.* 2002). Marella i saradnici (2006) su izolovali tri varijante *PpABI3* (eng. *P. patens* Arabidopsis B3 type transcription factor; Abscisic Acid Insensitive 3) gena iz ove vrste (*PpABI3A*, *PpABI3B* i *PpABI3C*). ABI3 je ključni faktor u iducibilnoj toleranciji na desikaciju kod *P. patens* (Khandelwal *et al.* 2010), što ukazuje na evolutivno konzerviranu ulogu ovog transkripcionog faktora kod kopnenih biljaka (Marella *et al.* 2006; Takezawa *et al.* 2011). Zhang *et al.* (2018) su opisali *ABI3* gen kod mahovine tolerantne na desikaciju, *Syntrichia caninervis* (*ScABI3*), kao i obrasce njegove ekspresije tokom dehidracije i rehidracije i niskih temperatura. Ovaj gen se povećano eksprimira kod *A. thaliana* u oksidativnom stresu i stresu izazvanom NaCl (Zhang *et al.* 2018).

U toku izlaganja biljaka stresu, nakon percepcije signala od strane odgovarajućih receptora sledi prenos tog signala do efektorskih molekula. Ipak, ispitivanje signalnog puta ABA je otežano zbog toga što često dolazi do njegovog preklapanja sa signalnim putevima drugih fitohormona, tako da zajedno čine veoma složenu signalnu mrežu. Tokom stresa izazvanog sušom, aktivni su sekundarni prenosioci signala: Ca<sup>2+</sup>, ciklična ADP riboza i Ca<sup>2+</sup>-zavisne kinaze. Međutim, najčešći posrednici u prenosu signala kod svih eukariotskih organizama su MAP kinaze. MAP kinaze su zadužene za fosforilaciju specifičnih ciljnih molekula, dovode do promene aktivnosti transkripcionih faktora i podstiču ekspresiju gena koji odgovaraju na spoljašnje stimulse (Danquah *et al.* 2013).

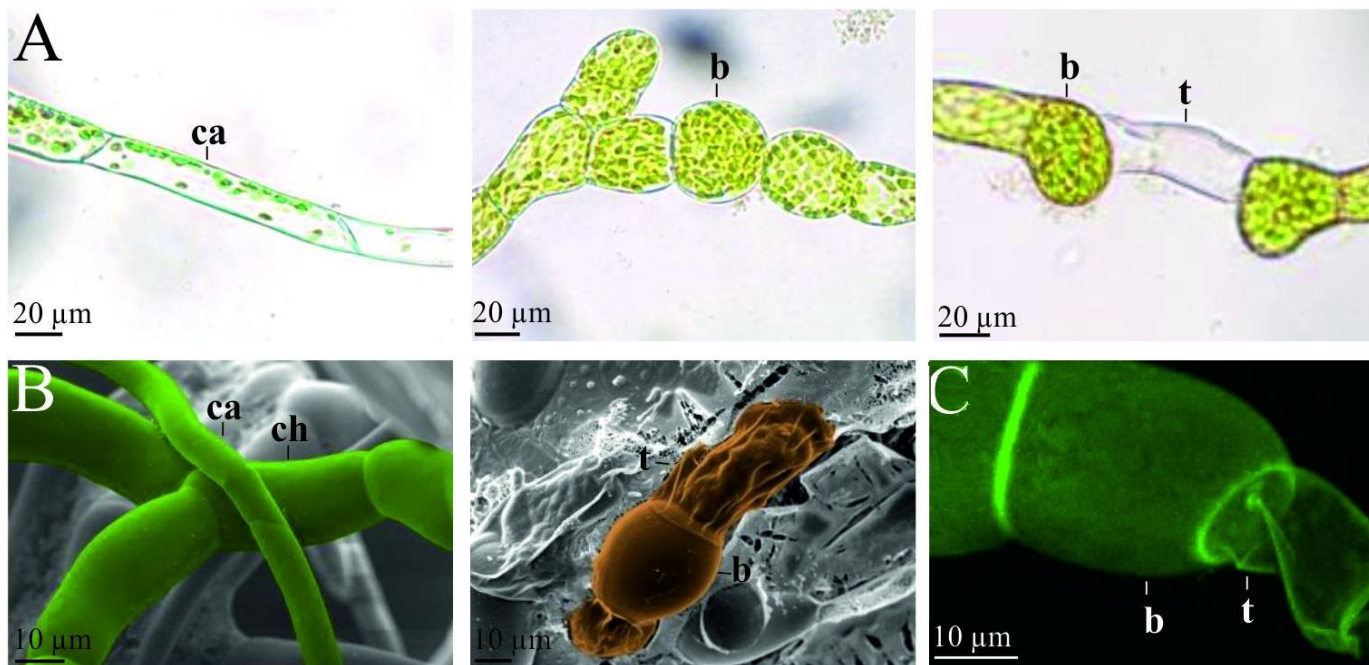
### 1.9.3. Uloga apscisinske kiseline u morfološkim promenama kod briofita

Prema rezultatima *in vitro* studija na briofitama, egzogena primena ABA dovodi do promena u rasteњу, razviću i diferencijaciji ćelija kod mahovina i jetrenjača (Goode *et al.* 1993; Schnepf & Reinhard 1997; Takezawa *et al.* 2011). Prisustvo ABA je demonstrirano kod svih grupa briofita. Najveća koncentracija ABA se može detektovati kod briofita koje rastu na sušnim staništima, dok je niska koncentracija tipična za one koje naseljavaju vlažna staništa, što ukazuje da je ABA ključni faktor koji doprinosi toleranciji na sušu (Hartung *et al.* 1994).

Proučavanjem regulacije ekspresije gena, ustanovljeno je da postoje brze promene u transkriptomu nakon aplikacije egzogene ABA. Naime, dolazi do ekspresije 1030 gena od kojih su neki definitivno u vezi sa formiranjem vegetativnih dijaspore, brahicita i modifikacijom ćelijskog zida kod briofita (Decker *et al.* 2006; Arif *et al.* 2019). Kao što je ranije napomenuto, brahicite su veoma otporne na isušivanje i mogu klijati nakon tri godine dormancije (Bopp & Werner 1993). Broj formiranih brahicita direktno zavisi od primenjene koncentracije, ali i dužine izloženosti ABA (Arif *et al.* 2019).

Brahicite *F. hygrometrica* imaju tanke zidove, male vakuole, lipidne kapljice u citoplazmi i redukovanu količinu skroba u plastidima (Schnepf & Reinhard 1997). Kod *P. patens* dolazi do unutarćelijskih promena indukovanih sa ABA, koje podrazumevaju dezintegraciju centralne vakuole,

porast količine skroba u plastidima i oleozoma u citoplazmi, ali smanjenje debljine ćelijskog zida. Na ovaj način je pokazano da su brahicite *P. patens* slične sa brahicitama *F. hygrometrica*, osim razlike u većoj količini skroba u plastidima *P. patens*. Formiranje tmema ćelija dolazi usled programirane ćelijske smrti, čime dolazi do fragmentacije protoneme, ali i nastanka brahicita (Slika 9). (Bopp *et al.* 1991; Arif *et al.* 2019). Tmema ćelije nastaju usled indukcije interkalarnih deoba ćelija od strane ABA (Prigge & Bezanilla 2010). Brahicite imaju funkciju vegetativnih spora ili su indukovane stresom ili egzogeno dodatom apscisionskom kiselinom. Kod briofita, inhibicija rastanja izdanka i formiranje gametofora u korist rasta protoneme je primer koordinisanog odgovora na ABA, kao zaštitu od stresa na različitim nivoima organizacije (Christianson 2000).



Slika 9. Formiranje brahicita i tmema ćelija na protonemi *P. patens* (Slika modifikovana prema publikaciji Arif *et al.* 2019).

Ranije studije pokazale su da egzogena ABA inhibitorno utiče na rastanje i razviće briofita (Chopra & Kapur 1989). Ćelije filamentozne protoneme su među najosetljivijim ćelijama na prisustvo egzogene ABA. Inhibicija rastanja protoneme pod uticajem ABA je uobičajena pojava, dovodeći do obrazovanja struktura sličnih gemama, koje se razvijaju kada se protonema izloži uslovima stresa (Goode *et al.* 1993). Egzogena ABA takođe inhibira diferencijaciju protoneme u gametofor sa filoidima, tako što u negativnoj sprezi sa citokininima, ABA inhibira diferencijaciju ćelija kauloneme u gametofore (Chopra & Kapur 1989; Christianson 2000). Egzogeno primenjena ABA utiče i na inhibiciju rastanja i razvića jetrenjača. Uprkos pomenutim eksperimentalnim dokazima o ulozi ABA na inhibiciju rastanja i povećanju tolerancije na stres, fiziološke uloge ABA kod jetrenjača su predmet sporenja. Međutim, različiti eksperimenti su potvrdili da ABA ima ulogu fitohormona i kod pojedinih jetrenjača (Takezawa *et al.* 2011).

#### 1.9.4. Uloga apscisionske kiseline u toleranciji stresa kod briofita

Pored brzih fizioloških odgovora biljaka, kao što je zatvaranje stoma, signalni put ABA vodi ka velikim promenama u ekspresiji gena, koje uključuju promene na transkripcionom nivou, obradi transkripata i stabilnosti produkata gena. ABA-responsivni geni igraju ključnu ulogu u toleranciji na

stres. Analiza promotora ovih gena pokazala je da je za njihovu ekspresiju neophodno prisustvo više *cis*-elemenata zvanih ABRE (eng. ABA-Responsive Elements). Oni sadrže sekvencu ACGT (Py ACGTGG/TC) za koju se vezuju transkripcioni faktori AREB/ABF. AREB/ABF proteini pripadaju grupi A bZIP transkripcionih faktora. Pored toga, ABRE se može kombinovati sa kuplujućim elementima kao što su CE1, CE3 (eng. Coupling element, CE) i DRE/CRT (eng. Dehydration Responsive Elements/C-repeat) (Umezawa *et al.* 2010). Pored toga, veliki broj ABA-responsivnih gena se indukuje solima, tj. ti geni su ujedno i „salt-inducible“, što ukazuje na veoma složen signalni put abiotičkog stresa. *Physcomitrella patens* ima isti način aktivacije ABRE *cis*-elemenata kao i vaskularne biljke, pa se smatra da je ovakav put konzerviran kod biljaka (Knight *et al.* 1995; Qudeimat *et al.* 2008).

Produkti gena koji su indukovani bilo stresom izazvanim solima, bilo apscisionskom kiselinom, pripadaju dvema kategorijama: regulatornim i funkcionalnim proteinima. Regulatorni proteini kontrolišu transdukciju signala i ekspresiju gena, kao što je već pomenuto, dok funkcionalni proteini imaju ulogu u razvoju mehanizama tolerancije biljke na sušu. Postoji barem 8 kategorija ABA-responsivnih proteina: za energiju i metabolizam ( $\beta$  subjedinica ATP sintaze), za odbranu od stresa (proteini bogati prolinom, proteini patogeneze), za sintezu i degradaciju (HSP70 proteini), za transkripciju i signalnu transdukciju ( $\text{Ca}^{2+}$ -zavisna protein kinaza), za ćelijski rast, transport i građu citoskeleta (Wang *et al.* 2010). Analiza proteoma potvrđuje da su neki od eksprimiranih gena specifični samo za stres izazvan solima, a da se neki eksprimiraju prilikom stresnog sindroma, kada se kombinuje više abiotičkih stresora (Wang *et al.* 2008a; 2008b; 2012). Proteini koji se sintetišu prilikom stresa izazvanog solima su uglavnom u vezi sa održavanjem energije i metabolizmom. Generalno, katabolički proteini su aktivniji kod briofita ukoliko se nalaze u stresnim uslovima. Pored promene u metabolizmu, odbrambeni proteini se sintetišu u značajnoj meri, prvenstveno antioksidativni enzimi i HS proteini (Wang *et al.* 2012). Postoje podaci je da COR (eng. Cold Regulated) proteini igraju bitnu ulogu tokom stresa izazvanog solima i osmotskog stresa kod briofita, ali i usled primene egzogene ABA (Frank *et al.* 2005; Wang *et al.* 2008b). Drugi ABA-responsivni geni kod *P. patens* pripadaju grupama II i III LEA proteina, posebno dehidrinima, MCamb1 i 2, AP2/EREBP transkripcionim faktorima, kao i genima PpDBF1, PpSHP1 i PpSHP2, čija je funkcija prethodno opisana (D'Souza & Johri 2002; Kroemer *et al.* 2004; Takezawa & Minami 2004; Saavedra *et al.* 2006; Ruibal *et al.* 2013). Još jedan gen čija je ekspresija pokrenuta egzogenom ABA, dehidratacijom i sa NaCl je *PCAI* kod *P. patens* koji kodira za  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-azu. Produkt gena je PIIB tip  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aza pozicionirana na tonoplastu. Ovaj protein igra ključnu ulogu u signalnom putu i toleranciji na stres izazvan NaCl (Qudeimat *et al.* 2008). Ekspresija gena za antioksidativne enzime *MDHAR1* i *MDHAR3* je povećana usled tretmana egzogenom apscisionskom kiselinom kod *P. patens* (Lunde *et al.* 2007).

Utvrđeno je da kod *P. patens* ABA ostavlja ulogu u odgovoru na dehidrataciju, niske temperature, povećanu koncentraciju soli i osmotski stres, mehaničke povrede, UV zračenje i napad patogena (Minami *et al.* 2003; Marella *et al.* 2006; Nagao *et al.* 2006; Cuming *et al.* 2007; Khandelwal *et al.* 2010, Wang *et al.* 2010; Takezawa *et al.* 2015; Zhao *et al.* 2018). Egzogeno ABA indukuje veoma brzo toleranciju na desikaciju i u protonemi i gametoforima *P. patens*, ako se ona generalno smatra vrstom osetljivom na dehidrataciju (Koster *et al.* 2010).

Značajnost ABA signalnog puta u postizanju tolerancije na desikaciju je demonstrirano preko dvostrukih „knock-out“ mutanata za gen *ABII* kod *P. patens*. Pokazano je da nedostaje negativna kontrola ABA signalnog puta i da su protoneme ovakvih mutanata konstitutivno tolerantne na isušivanje (Komatsu *et al.* 2009). Pored toga, transgena *P. patens* za *ABI3* gen dokazuje da ovi transkripcioni faktori regulišu ekspresiju gena posredstvom ABA, posebno nakon tretmana sa

egzogenom ABA (Khandelwal *et al.* 2010). Stevenson *et al.* (2016) su ukazali da je *ABA-Non-Responsive* gen kod *P. patens* neophodan za toleranciju na desikaciju indukovanu preko ABA. Svi ovi rezultati ukazuju da egzogeno dodata ABA ostvaruje svoje efekte preko ustaljene ABA signalne kaskade, kako bi dovela do tolerancije na isušivanje kod *P. patens*. U skladu sa ovim se može pretpostaviti da za sticanje tolerancije jeste zadužena endogena ABA, čiji nivo se povećava usled spoljašnjih stimulusa, kao što je postepeno isušivanje ili egzogena ABA.

Uticaj egzogene ABA na ekspresiju gena kod *P. patens* je do sada opisan kroz aktivaciju ABRE-responsivnih *cis* elemenata. Međutim, analizom ekspresije gena za mnogobrojne transkripcione faktore (TF) i druge transkripcione regulatore (TR) koji pripadaju tzv. TAP proteinima (eng. Transcription-associated protein) (Richardt *et al.* 2010), utvrđena je brza ekspresija gena usled egzogene primene soli i/ili ABA. Rezultati istraživanja su pokazali da kod *P. patens*, kao i kod semenica (Yamagushi-Shinozaki and Shinozaki 2006), TAP geni bivaju transkripciono regulisani tokom prvog sata, kao odgovor na stres izazvan solima i egzogeno primenjenu ABA. Kod *A. thaliana*, ali i kod *P. patens*, veći je uticaj ABA na aktivaciju ekspresije *TAP* gena aktiviranih nego visoka koncentracija soli, upravo zbog toga što ABA posreduje u mnogim odgovorima na različite tipove abiotičkog stresa. Međutim, kod *P. patens* za razliku od *A. thaliana*, ekspresija gena je produžena i nakon nekoliko sati, što ukazuje na moguće dugotrajnije efekte stresa solima na ekspresiju TAP gena. Odgovor na egzogenu ABA se sistemski brže detektuje u protonemi *P. patens*, što se objašnjava time da ovi filamentni imaju potrebu za brzim adaptivnim odgovorima kako bi omogućili preživljavanje nepovoljnih uslova (Richardt *et al.* 2010).

Iako se uloga ABA proučava decenijama, relativno mali broj ispitivanja je vršen na drugim vrstama briofita osim na *P. patens*, pa mehanizmi delovanja ABA u većoj meri nisu poznati (Sabovljević *et al.* 2014). Protonema vrste *F. hygrometrica*, koja ne toleriše brzo isušivanje, u kulturi *in vitro* akumulira endogenu ABA tokom procesa sporog isušivanja. Dodatno, egzogena primena ABA na protonemu dovodi do razvoja tolerancije na brzo isušivanje (Werner *et al.* 1991).

Mnogobrojne mahovine i jetrenjače mogu da prežive ekstremno isušivanje usled postojanja efikasnih mehanizama tolerancije desikacije, koji su pretežno posredovani apscisionskom kiselinom. Povećanje nivoa endogene ABA tokom dehidratacije je dokumentovano kod taloidne jetrenjače *Exormotheca holstii* i vodene jetrenjače *R. fluitans* (Werner *et al.* 1991; Hellwege *et al.* 1992; 1994), kao i kod *Plagiochila* sp. i *M. polymorpha* (Pence *et al.* 2006; Takezawa *et al.* 2011). Međutim, informacije o efektima i mehanizmima delovanja ABA u ovim slučajevima su nepotpune. Sve vrste briofita koje su do sada proučavane pokazuju različite fiziološke i biohemijske odgovore na egzogenu ABA, pa se ne može jasno opisati jedinstven mehanizam odgovora (Vujičić *et al.* 2016; 2017).

## 1.10. Biologija ispitivanih vrsta

Za ovu disertaciju su odabrane tri vrste mahovina: model vrsta *Physcomitrella patens* za koju se smatra da nije halofita, ali toleriše visoke koncentracije soli u podlozi u određenoj meri i dve vrste brio-halofita *Entosthodon hungaricus* i *Hennediella heimii*, koje se smatraju fakultativnim brio-halofitama.

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

Vrsta *Physcomitrella patens* (Slika 10 i 11) je efemerna mahovina, koja se razvija u rano leto, uglavnom od spora koje su prezimele. Široko je rasprostranjena u umerenoj zoni Evrope, Severne Amerike i Istočne Azije (Medina *et al.* 2019) gde najčešće nastanjuje obale reka, jezera i bara,



odnosno, staništa koja su pod čestim uticajem slatke vode (Cove 2005). Pored ovih staništa, *P. patens* se često može naći i na zemljištu koje je izloženo vlažnim periodima, a koje se ne nalazi u blizini reka. Kratkog je životnog ciklusa. Umerene temperature i kraći dan su pogodni za indukciju gametogeneze, te se polni organi razvijaju u jesen (Hohe *et al.* 2002).



### Klasifikacija vrste

Bryophyta

Bryopsida

Funariales

Funariaceae

*Physcomitrella*

*Physcomitrella patens*

Slika 10. *Physcomitrella patens* u prirodnom staništu. (Slika preuzeta sa sajta: [https://inpn.mnhn.fr/espece/cd\\_nom/435566/tab/archo](https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/435566/tab/archo)).

Familija Funariaceae odlikuje se malim, zelenim, akrokarpnim biljakama koje formiraju žbunaste tvorevine. Gametofiti su zelene boje sa kratkim, uspravnim kauloidom koji se ne grana, a izgrađen je od tankozidih izduženih ćelija. Filoidi su ovalnog do lanceolastog oblika, postavljeni spiralno na kauloidu. Generalno su jednoslojni, osim središnjeg dela (*costa*) izgrađenog od dva ili tri sloja ćelija. Laminarne ćelije variraju od romboidnog do kvadratnog oblika sa uređeno raspoređenim hlorofilima. Na gametofitu se razvijaju seksualni organi, anteridije i arhegonije, koji se uočavaju izdignuti sa apeksa gametofita. Seksualni organi se razvijaju terminalno, a odlikuje ih kleistokarpan sporofit koji se otvara pucanjem, jer ova vrsta ne poseduje peristomalne zupce, niti operkulum, koji je prisutan kod većine vrsta ove familije. Sporofit se nalazi na kratkoj dršci i završava se okruglom kapsulom obavijenom tankom kaliptrom.



Slika 11. *Physcomitrella patens* gajena u kulturi *in vitro*.

*Physcomitrella patens* je veoma značajna vrsta u oblasti fiziologije i molekularne biologije biljaka. Prva je nevaskularna biljka čiji je haploidni genom kompletno sekvenciran (Rensing *et al.* 2008). Ima 27 hromozoma ukupne veličine 510 Mbp (Lang *et al.* 2008). Gransden tip iz Velike Britanije je ustanovljen kao model ove vrste još 1962. godine i od tada se koristi kao genetički sistem za izolovanje i proučavanje mutanata, evolucije signalnih puteva fitohormona ABA (Knight *et al.* 1995; Khandelwal *et al.* 2010; Richardt *et al.* 2010), targetovanje gena korišćenjem homologne rekombinacije (Girke *et al.* 1998), seksualne reprodukcije (Hohe *et al.* 2002), transkripcije (Rensing *et al.* 2002) i od skoro biologije ćelije. Analize genoma su pokazale da nasuprot cvetnicama, *P. patens* ima homogeno raspoređene gene i transpozibilne elemente u hromozomima (Lang *et al.* 2008). Poređenjem genoma *P. patens* sa poznatim genomima vaskularnih biljaka došlo se do saznanja da postoje slični mehanizmi prilagođavanja stresnim uslovima na staništu. Od posebnog značaja za oblast fiziologije stresa su informacije da *P. patens* pokazuje visok stepen tolerancije na abiotičke stresore, prvenstveno stres suše i osmotski stres (Rensing *et al.* 2008).

Opisana vrsta je poznata i po drugim nazivima: *Physcomitrium patens* (Hedw.) Mitt., *Ephemerum patens* (Hedw.) Hampe i *Aphanorrhagma patens* (Hedw.) Lindb. S obzirom na to da najnoviji podaci ukazuju da je *Physcomitrella patens* izvedeni član familije i može biti sestrinska vrsta kladi *Physcomitrium*-a (Medina *et al.* 2019), pa bi adekvatnije bilo da se koristi naziv *Physcomitrium patens* (Hedw.) Mitt. (Medina *et al.* 2019; Rensing *et al.* 2020).

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

Vrsta *Entosthodon hungaricus* (Slika 12 i 13) je sitna vrsta, visine oko 6-7 cm, zelene boje. Donji filoidi su sitniji jajastog oblika, za razliku od gornjih filoida koji su veći, konkavni i uskih apikalnih delova. Čelije filoida su tankih zidova, sa manjim brojem hloroplasta raspoređenih u grupama. U središnjem delu su ćelije oblika kvadrata, kao i na marginama lista, dok su ka apeksu romboidalne. Sporofiti su uglavnom pojedinačni. Seta je dužine oko 4 mm, uspravna i simetrična (Pisarenko *et al.* 2001).





### Klasifikacija vrste

Bryophyta

Bryopsida

Funariales

Funariaceae

*Entosthodon*

*Entosthodon hungaricus*

Slika 12. *Entosthodon hungaricus* u prirodnom staništu (Slika preuzeta iz publikacije Čosić *et al.* 2019).

Uglavnom se može sresti u proleće na suvim i zaslanjenim staništima umerene zone. *Entosthodon* je evropska endemična vrsta, čija je distribucija diskontinuirana, pa se stoga nalazi na specifičnim lokalitetima, kao što su suve stepe i solonjeci (Pisarenko *et al.* 2001). Ova vrsta se smatra ugroženom i retkom vrstom zbog svoje specifične ekologije i efemernih odlika (Sabovljević *et al.* 2012), a takođe se smatra fakultativnom halofitom (Sabovljević & Sabovljević 2007). Pored navedenog naziva, ova vrsta je poznata i kao *Funaria hungarica* Boros.



Slika 13. *Entosthodon hungaricus* gajena u kulturi *in vitro*.

### 1.10.3. *Henediella heimii* (Hedw.) R. H. Zander

Vrsta *Henediella heimii* (Slika 14 i 15) obično nastanjuje obale slanih ili brakičnih voda, kao što su slane močvare i blatnjave depresije. Pored toga, može se naći i na zaslanjenim zemljištima unutar

kopna, gde nije u direktnoj vezi sa slanom vodom, kao i pored prometnih puteva sa kojih se kišom spiraju soli. Ovo je retka i ugrožena vrsta, koja se smatra obligatnom brio-halofitom (Zander 1993).



### Klasifikacija vrste

Bryophyta

Bryopsida

Pottiales

Pottiaceae

*Hennediella*

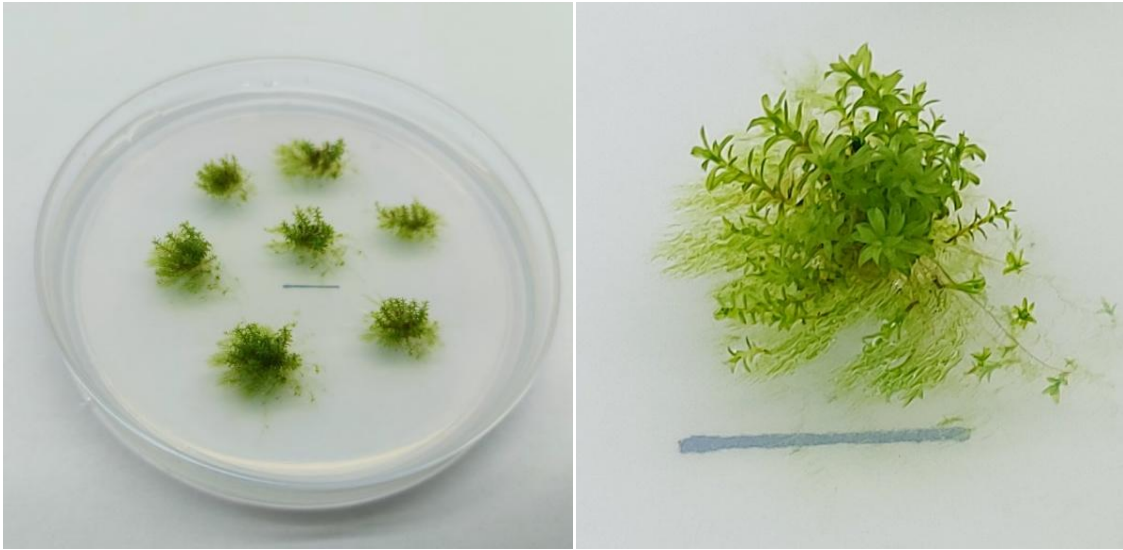
*Hennediella heimii*

Slika 14. *Hennediella heimii* u prirodnom staništu (Slika preuzeta od autora M. Lüth).

*Hennediella heimii* je izuzetno sitna vrsta, visine svega od 2 mm - 2 cm. Raste u busenovima veličine oko 25 mm, a boja joj varira od zelene do braonkaste boje. Gametofiti su slični drugim efemernim vrstama. Međutim, glavna karakteristika ove vrste je nazubljen vrh filoida, odnosno dve ćelije susedne apikalnoj ćeliji su špicastih vrhova. Filoidi su dužine 1,5-2 mm, izdužuju se vremenom i postavljaju se paralelno sa vrhom kratkog kauloida. Oblik filoida se kreće od ovalnog do nazubljenog sa uzraženim srednjim rebrom. Filoidi su jednoslojni sa ćelijama koje su izdužene i debelih ćelijskih zidova. Većina listova je nazubljena prema vrhu. Za ovaj takson nije karakterističan polimorfizam, a podrazumevaju se varijacije u diferencijaciji i veličini, obliku distalnih ćelija, ivičnoj dentaciji, dužini kapsule sporofita (Longton 1992).

Za sporofite je karakteristična duga, tanka i izuvijana seta dužine do 1 cm. Kapsula je specifična, sa otvorom oko 1-2,4 mm, koji je dugačak i koso postavljen. Pri zrelosti kapsula se podiže iznad otvora i to pomoću čvrstog stubića izgrađenog od unutrašnjeg tkiva kapsule (kolumele), što daje karakterističan izgled čarobnjakovog šešira. Kada poklopac otpadne sa čaure, oslobađaju se spore.

Pored navedenih naziva, *Hennediella heimii* je poznata i kao *Gymnostomium heimii* (Hedw.) Sp. Musc. Frond, *Desmatodon heimii* (Hedw.) Mitten i *Pottia heimii* (Hedw.) Fürnrohr.



Slika 15. *Henediella heimii* gajena u kulturi *in vitro*.

## 2. CILJEVI RADA

Osnovni ciljevi ove doktorske disertacije su:

- Ispitivanje uticaja egzogeno dodate apscisinske kiseline kod odabranih vrsta mahovina na stres izazvan natrijum-hloridom
- Praćenje promena na morfološkom nivou usled delovanja natrijum-hlorida, apscisinske kiseline, te usled njihovog kombinovanog delovanja
- Praćenje promena na biohemijskom nivou: koncentracija i sadržaja šećera, fenolnih jedinjenja i terpenoida u uslovima povećanog prisustva natrijum-hlorida i apscisinske kiseline, kao i usled njihovog kombinovanog dejstva
- Histoheмиjska analiza ispitivanih metabolita
- Praćenje produkcije reaktivnih oblika kiseonika i kvantifikacija sekundarnog, oksidativnog stresa u eksperimentalnim uslovima kod odabranih vrsta mahovina
- Definisane mehanizama tolerancije odabranih vrsta mahovina i njihove rezistencije na dugotrajni stres izazvan natrijum-hloridom
- Definisane sličnosti i razlika u mehanizmima odgovora na stres izazvan natrijum-hloridom između ispitivanih vrsta
- Definisane uloge apscisinske kiseline u odgovoru ispitivanih vrsta mahovina na stres izazvan natrijum-hloridom

### 3. MATERIJAL I METODE

Kao polazni materijal za sve eksperimentalne postavke korišćeni su izdanci tri vrste mahovina gajenih u kulturi *in vitro* (*Physcomitrella patens*, *Entosthodon hungaricus* i *Hennediella heimii*). Biljni materijal za uspostavljanje kultura vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* sakupljen je sa zaslanjenih staništa na teritoriji Mađarske (leg. Marko Sabovljević), dok je kultura vrste *P. patens* umnoženi genotip „Gransden“ dobijen iz BioTech laboratorije Univerziteta u Frajburgu. Uspostavljene kulture dobijene su iz kolekcije BBGB, grupe za Biologiju Briofita Univerziteta u Beogradu. Pre eksperimenata sve tri vrste mahovina su umnožavane *in vitro* tehnikama, kako bi se dobilo dovoljno biljnog materijala za postavku eksperimenta.

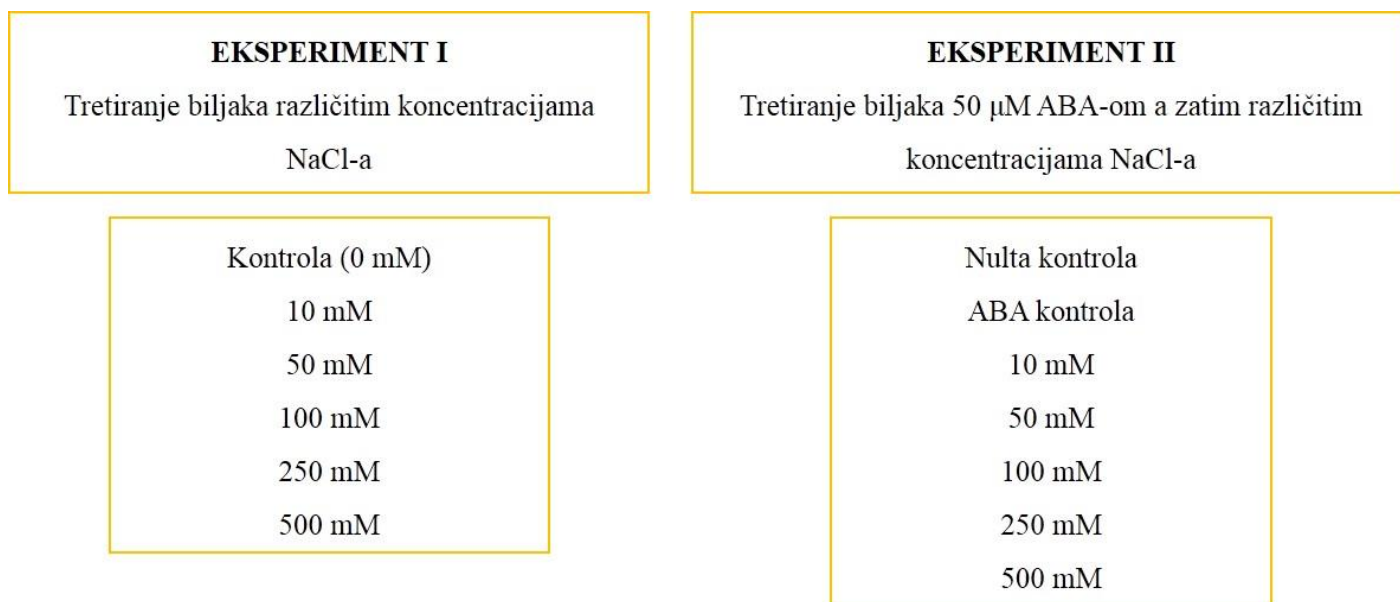
#### 3.1. Dizajn eksperimenta

Eksperimentalne postavke u okviru ove doktorske disertacije sastojale su se od dva nezavisna eksperimenta. Eksperiment I podrazumeva gajenje biljaka na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl u trajanju od 21 dan, što predstavlja dugotrajni stress izazvan solima. Biljke su tretirane različitim koncentracijama NaCl, dok je kontrolna grupa biljaka gajena na hranljivoj podlozi bez dodatka NaCl. Za eksperimente u kojima su praćeni parametri morfogeneze i fotosintetički pigmenti korišćene su koncentracije NaCl od 10, 50, 100, 250 i 500 mM, dok su za sve ostale analize odabrane dve koncentracije NaCl (50 i 250 mM) za koje se pretpostavlja da najbolje pokazuju promene u stresnim uslovima kod sve tri vrste.

U eksperimentu II eksplantati su izlagani tretmanu apscisionskom kiselinom koncentracije 50  $\mu\text{M}$  tokom 72 h, odnosno, gajeni na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50  $\mu\text{M}$  ABA. Nakon navedenog predtretmana, biljke su prebaćene na hranljivu podlogu sa dodatkom NaCl po istom principu kao u i eksperimentu I i gajene na taj način tokom 21 dana. Za razliku od eksperimenta I u kome je postojala jedna kontrola, odnosno biljke gajene na podlozi bez dodatka soli, u eksperimentu II postoje dve kontrole: nulta kontrola, koja predstavlja biljke gajene na podlozi koja ne sadrži ni ABA, ni NaCl i ABA-kontrola, koja predstavlja biljke gajene na podlozi sa 50  $\mu\text{M}$  ABA, ali bez prisustva NaCl. Ova kontrola je neophodna kako bi se utvrdilo na koji način ABA samostalno, u odsustvu stresa, utiče na ispitivane parametre testiranih mahovina. Dizajn oba tipa eksperimenta je prikazan šematski na slici 16.

Za oba tipa eksperimenta i za sve tretmane sa ABA i NaCl, postavljane su po 4 Petri kutije po eksperimentu, sa po 15 eksplantata (gametofora) približno iste veličine od 7 mm. Eksperimentalne postavke su gajene u kontrolisanim uslovima u specijalizovanim komorama za gajenje biljaka na Insitutu za botaniku i Botanička bašta „Jevremovac“ tokom 21 dana. Kontrolisani uslovi podrazumevaju konstantnu temperaturu ( $18 \pm 2^\circ\text{C}$ ), vlažnost (60-70%) i osvetljenje (uslovi dugog dana – 16h svetlo, 8h mrak). Kao izvor svetlosti korišćene su fluorescentne cevi „Tesla“ Pančevo, 65W, fluksa  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Nakon završetka eksperimenta, uzorci su sakupljeni sa hranljive podloge i merena je sveža masa biljaka. Biljni materijal je korišćen svež za određene analize ili je čuvan u zamrzivaču na  $-70^\circ\text{C}$ , kako bi se koristio za druge tipove analiza.



Slika 16. Šematski prikaz dizajna eksperimenata

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

Eksperimenti koji podrazumevaju korišćenje *in vitro* kultura i tehnika podrazumevaju sterilizaciju svih neophodnih posuda, instrumenata i hranljivih podloga, kao i rad u laminarnoj komori kako bi se izbegla kontaminacija biljnog materijala. Na ovaj način se omogućavaju sterilni uslovi za eksperimentisanje i dobijanje validnih rezultata.

Hranljive podloge i stakleno posuđe se sterilise u autoklavu tokom 30 minuta, na temperaturi od 114 °C i pritisku od 0,67 bara (0,067 MPa ili 0,8 atm). Plastične Petri kutije u koje se razliva hranljiva podloga su prethodno sterilisane (Ø 90, Aptaca S.p.A., Canelli, Italy).

Manipulisanje biljnim materijalom i razlivanje sterilisane hranljive podloge se obavlja u laminarnoj komori u kojoj je obezbeđena sterilna atmosfera posredstvom specijalizovanih filtera kroz koje se u prostor laminara uduvava sterilan vazduh. Radni protor laminara se pre rada dezinfikuje sa 96 % etanolom.

Svi instrumenti korišćeni za rad sa biljnim materijalom se sterilisu neposredno pre rada iskuvavanjem u destilovanoj vodi tokom 30 minuta. Nakon iskuvavanja, instrumenti se prebacuju u posudu sa 96 % etanolom, a zatim se dodatno sterilisu spaljivanjem nad plamenikom špiritusne lampe u laminarnoj komori.

### 3.3. Sastav hranljivih podloga

Sastav hranljivih podloga generalno varira u zavisnosti od vrste, biljnog materijala i cilja eksperimenta. Svaka hranljiva podloga mora da sadrži osnovne sastojke koji omogućavaju pravilno rastenje i razviće biljaka u kulturi. Svaka hranljiva podloga se priprema prema već unapred ustanovljenom protokolu, u kome je količina neophodnih supstanci izražena na jedan litar podloge.



Za umnožavanje biljnog materijala i održavanje kultura korišćena je minimalna KNOP hranljiva podloga (Reski & Abel 1985) obogaćena šećerom, odnosno, KNOP S/2 podloga, u koju je dodavana saharoza kao izvor ugljenika zarad postizanja bržeg rasta mahovina. Za postavku eksperimenata je korišćena KNOP hranljiva podloga bez dodatka šećera, kako bi se smanjio uticaj šećera iz podloge u eksperimentima. Protokol za pravljenje KNOP i KNOP S/2 hranljive podloge prikazan je u tabeli 1. Pre sterilizacije u autoklavu pH hranljivog medijuma podešavan je tako da bude između 5,8 i 6,0, jer je pH vrednost veoma bitna za apsorpciju mineralnih elemenata iz podloge od strane biljaka.

Tabela 1. Sastav hranljivih podloga KNOP i KNOP S/2

<b>Komponente hranljive podloge</b>	<b>Količina supstance na 1 L hranljive podloge</b>
Agar	8 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10 ml
KCl	10 ml
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	50 ml
Saharoza (KNOP S/2)	15 g
Voda	do 1000 ml

U eksperimentu I korišćene su KNOP podloge sa različitim koncentracijama NaCl. Soli se dodaju u podlogu pre autoklaviranja, s obzirom na to da je NaCl termostabilna supstanca. Za svaku eksperimentalnu postavku hranljiva podloga se priprema sveža. U tabeli 2 prikazana je količina NaCl koja se koristi za pripremu 100 ml KNOP podloge. Sve vrednosti su preračunate u odnosu na 1 M supstance i 1 L podloge.

Tabela 2. Količina NaCl korišćena u postavci eksperimenata

Koncentracija NaCl	Količina NaCl (g) za 100 ml hranljive podloge
Kontrola (bez soli)	-
10 mM	0,0584
50 mM	0,2922
100 mM	0,5844
250 mM	1,4610
500 mM	2,9220

Radna koncentracija štoka ABA je 0,1-10 mg/L. Za razliku od NaCl, ABA se dodaje u podlogu nakon sterilizacije u autoklavu, jer je termolabilna supstanca. ABA se naknadno sterilize filtracijom kroz specijalizovane sterilne filtere promera pora 0,2  $\mu\text{m}$  (Axiva, Axiva Slichem Pvt. Ltd., Kundli, Sonipat, India) u laminarnoj komori.

U eksperimentu II korišćene su KNOP hranljive podloge sa dodatkom ABA, finalne koncentracije 50  $\mu\text{M}$ . Pored podloge sa dodatkom ABA, pripremane su i podloge sa dodatkom NaCl, kao u eksperimentu I.

### 3.4. Analiza morfofenetskih parametara

Svi morfofenetski parametri (preživljavanje, indeks multipikacije i prečnik sekundarne protoneme) proučavani su vizuelno uz pomoć binokularne lupe (Leica MZ 7.5 Bi-Optic Inc., Santa Clara, California, USA) i mikroskopa (AxioVision 4.8.2 SPS Zeiss, Göttingen, Germany). Preživljavanje je određivano vizuelnim pregledom osnovnih karakteristika živih biljaka (veličina biljke, novoformirani pupoljci i protoneme, boja i oblik listova). Indeks multiplikacije određivan je prebrojavanjem novoformiranih pupoljaka i izdanaka uz korišćenje binokularne lupe. Prečnik sekundarne protoneme je meren korišćenjem milimetarskog papira. Svi morfofenetski parametri su na isti način mereni kod sve tri vrste, odmah nakon završetka eksperimenta I i eksperimenta II, odnosno nakon 21. i 24. dana.

### 3.5. Spektrofotometrijska analiza fotosintetičkih pigmenata

Za izolvanje fotosintetičkih pigmenata korišćeno je po 20 mg svežeg biljnog materijala iz svake eksperimentane postavke, koji je odmeren u prethodno obeležene i pripremljene mikro tube. U mikro tube sa biljnim materijalom je dodato 2 ml 96% etanola, a zatim je vršena ekstrakcija pigmenata zagrevanjem na termošejkeru (TS-100 Biosan Ltd., Riga, Latvia) tokom 10 minuta na temperaturi od



70 °C. Nakon ekstrakcije tečna faza je prebačena u kvarcnu kivetu i merena je apsorbanca ekstrakata na tri talasne dužine: 470 nm, 648 nm i 664 nm. Apсорbanca je merena na UV-visible spektrofotometru tipa Agilent 8453 (Agilent Technologies, Inc., Mulgrave, Australia). Dobijene vrednosti apsorbaneci korišćene su u formulama prema Lichtenthaler-u (1987) (Slika 17) za izračunavanje koncentracije ukupnih hlorofila i karotenoida, kao i koncentracije hlorofila a i hlorofila b u analiziranim uzorcima. Količine pigmenata se preračunavaju u odnosu na suhu masu uzoraka, koja se dobija sušenjem biljnog materijala tokom 7 dana na sobnoj temperaturi.

Hlorofil a:	$C_a = 13.36 A_{664} - 5.19 A_{648}$
Hlorofil b:	$C_b = 27.43 A_{648} - 8.12 A_{664}$
Ukupna količina hlorofila:	$C_{(a+b)} = 5.24 A_{664} + 22.24 A_{648}$
Ukupna količina karotenoida:	$C_{(x+c)} = (1000 A_{470} - 2.13 C_a - 97.64 C_b) / 209$
Odnos hlorofila a i b je računat po formuli $C_a/C_b$	

Slika 17. Formule za računanje fotosintetičkih pigmenata prema Lichtenthaler-u (1987)

### 3.6. Analiza fenolnih jedinjenja i terpenoida

Za određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i određivanje antioksidativnog kapaciteta biljaka korišćene su različite antioksidativne analize. Priprema uzoraka za analize se vrši na sledeći način: 300 mg svežeg biljnog materijala je ekstrahovano u 20 ml metanola tokom 24h, pri čemu su prvi sat i poslednji sat ekstrakti inkubirani na ultrazvučnom kupatilu. Nakon ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani kroz filtre čije su pore promera 0,2 μm (Captive Premium, Agilent, Denmark). Takvi ekstrakti su zatim uparavani na vakuum uparivaču (IKA RV 3, Germany) nakon čega je izmeren prinos. Upareni ekstrakti se rastvaraju u metanolu, tako da finalna koncentracija bude 10 mg/mL.

#### 3.6.1. Određivanje količine ukupnih fenola Folin – Ciocalteu metodom

Za određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja korišćena je procedura prema Singleton & Rossi (1965), koja podrazumeva da se u svaki bunarić mikrotitracione pločice odmeri po 20 μL ekstrakta, a zatim doda i po 100 μL rastvora Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 6 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi dodaje se 80 μL rastvora natrijum-karbonata. Negativna kontrola (slepa proba) je pripremljena tako da sadrži sve komponente osim uzorka, umesto koga se dodaje destilovana voda. Apсорbanca se očitava na 740 nm pomoću čitača mikrotitracionih ploča Multiscan Sky Thermo Scientific, Finland, nakon inkubacije od 120 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi. Sva merenja su vršena u četiri ponavljanja. Za konstruisanje kalibracione krive umesto ekstrakta korišćena je galna kiselina rastvorena u destilovanoj vodi. Ukupan sadržaj fenola u uzorcima je izračunat iz jednačine kalibracione krive i predstavljen je u ekvivalentima galne kiseline kao mg GAE/g suvog ekstrakta.

#### 3.6.2. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Za određivanje ukupnog sadržaja fenolnih kiselina korišćena je metoda Mihailović *et al.* (2016) uz određene modifikacije. U svaki bunarić na mikrotitracionoj ploči je odmereno po 10 μL ekstrakta, nakon čega je dodato po 20 μL Arnovog reagensa (10% w/v natrijum-molibdat, 10% w/v natrijum-

nitrat), 20  $\mu\text{L}$  0,1 M hlorovodonične kiseline i 20  $\mu\text{L}$  1 M natrijum-hidroksida. U smešu svih dodatih komponenti dodato je po 100  $\mu\text{L}$  destilovane vode. Negativna kontrola (slepa proba) je pripremljena tako da sadrži sve komponente osim uzorka, umesto koga se dodaje 50% etanol. Apsorbanca se očitava na 490 nm odmah nakon dodavanja svih komponenti, pomoću čitača mikrotitracionih ploča Multiscan Sky Thermo Scientific, Finland. Za konstruisanje kalibracione krive umesto ekstrakta korišćena je kafena kiselina rastvorena u 50% etanolu u koncentracijama od 0,0078-1 mg/mL. Sva merenja su ponovljena četiri puta. Ukupan sadržaj fenolnih kiselina u uzorcima je izračunat iz jednačine kalibracione krive i predstavljen ekvivalentima kafene kiseline kao mg CAE/g suvog ekstrakta.

### **3.6.3. Određivanje ukupnih flavonoida**

Za određivanje ukupnog sadržaja flavonoida je korišćena metoda po Park *et al.* (1997), koja podrazumeva da se u svaki bunarić na mikrotitracionoj ploči odmeri po 50  $\mu\text{L}$  ekstrakta, a zatim doda 205  $\mu\text{L}$  80% etanola, 5  $\mu\text{L}$  10% aluminijum-nitrat nonahidrata i 5  $\mu\text{L}$  1 M rastvora kalijum-acetata. Negativna kontrola (slepa proba) je pripremljena tako da sadrži sve komponente osim uzorka, umesto koga se dodaje 86% etanol. Apsorbanca se očitava na 415 nm nakon inkubacije od 40 minuta u mraku na sobnoj temperaturi, pomoću čitača mikrotitracionih ploča Multiscan Sky Thermo Scientific, Finland. Za konstruisanje kalibracione krive umesto ekstrakta korišćen je kvercetin rastvoren u 96% etanolu u koncentracijama 0,005-0,200 mg/mL. Sva merenja su ponovljena četiri puta. Ukupan sadržaj flavonoida se izračunava iz jednačine kalibracione krive i izražava se u ekvivalentima kvercetina kao mg QE/g suvog ekstrakta.

### **3.6.4. Određivanje ukupnih flavonola**

Za određivanje ukupnog sadržaja flavonola korišćena je metoda po Mihailović *et al.* (2016) uz određene modifikacije. U svaki bunarić na mikrotitracionoj ploči je odmereno po 40  $\mu\text{L}$  ekstrakta rastvorenih u 100% metanolu, nakon čega je dodato 40  $\mu\text{L}$  metanalnog rastvora aluminijum hlorida (20 mg/mL) i 120  $\mu\text{L}$  metanalnog rastvora natrijum-acetata (50 mg/mL). Negativna kontrola (slepa proba) je pripremljena tako da sadrži sve komponente osim uzorka, umesto koga se dodaje 100% metanol. Apsorbanca se očitava na 440 nm nakon inkubacije od 150 minuta u mraku na sobnoj temperaturi, pomoću čitača mikrotitracionih ploča Multiscan Sky Thermo Scientific, Finland. Za konstruisanje kalibracione krive umesto ekstrakta korišćen je kvercetin rastvoren u 100% metanolu u koncentracijama 0,0078-1 mg/mL. Sva merenja su ponovljena četiri puta. Ukupan sadržaj flavonoida se izračunava iz jednačine kalibracione krive i izražava se u ekvivalentima kvercetina kao mg QE/g suvog ekstrakta.

### **3.6.5. Određivanje ukupnih kumarina**

Za određivanje ukupnog sadržaja kumarina korišćena je metoda prema de Amorim *et al.* (2012) uz određene modifikacije. U svaki bunarić na mikrotitracionoj ploči je odmereno po 2  $\mu\text{L}$  ekstrakta rastvorenih u 80% metanolu, nakon čega je dodato 8  $\mu\text{L}$  destilovane vode i 2  $\mu\text{L}$  olovo-acetata (5% w/v). U napravljenu smešu je dodato po 28  $\mu\text{L}$  destilovane vode i 160  $\mu\text{L}$  0,1 M hlorovodonične kiseline. Negativna kontrola (slepa proba) je pripremljena tako da sadrži sve komponente osim uzorka, umesto koga se dodaje 100% metanol. Apsorbanca se očitava na 320 nm nakon inkubacije od 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi, pomoću čitača mikrotitracionih ploča Multiscan Sky Thermo Scientific, Finland. Za konstruisanje kalibracione krive umesto ekstrakta korišćen je kumarin rastvoren u 100% metanolu u koncentracijama 0,005-1 mg/mL. Sva merenja su ponovljena četiri puta. Ukupan sadržaj kumarina se izračunava iz jednačine kalibracione krive i izražava se u ekvivalentima kumarina kao mg CE/g suvog ekstrakta.

### 3.6.6. Određivanje fenolnih jedinjenja UHPLC/ DAD/ (±) HESI - MS2 analiza sadržaja fenolnih jedinjenja

Priprema uzoraka za hromatografsko razdvajanje je obavljena na sledeći način: 200 mg biljnog materijala je usitnjeno do finog praha u tečnom azotu pomoću avana i tučka nakon čega se dodaje 1 ml metanola i prebacuje u obeležene mikro tube. Neophodno je sve vreme držati uzorke na ledu da ne bi došlo do otapanja i moguće degradacije jedinjenja u ekstraktima. Ekstrakti se dobro promešaju na vorteksu, a zatim dodatno rastvaraju na ultrazvučnom kupatilu 10 minuta. Nakon toga ekstrakti su centrifugirani što dovodi do razdvajanja dve faze: gornje – tečne faze i donje – čvrste faze. Pažljivo se odvaja tečna faza i dodatno filtrira kroz specijalne filtre sa porama od 0,2  $\mu\text{m}$  (Captiva Premium, Agilent, Denmark) i prebacuje se u staklene vajiće sa poklopcem. Dobijeni metanolni ekstrakt se dalje koristi za hromatografsko razdvajanje na aparatu.

Hromatografsko razdvajanje ekstrakata je urađeno na Dionex Ultimate 3000 UHPLC sistemu (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) u čijem se sklopu nalazi binarna pumpa, vakum degaser, termosta za kolone, auto-sempler i UV/VIS detector (DAD, eng. diode array detector). UHPLC system je konfigurisan sa triple-quadrupole masenim spektrofotometrom (TSQ Quantum Access MAX, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) sa elektron sprej jonizacijom (HESI, eng. heated electrospray ionization). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Hypersil gold C18 kolona (50x2.1 mm) koja se odlikuje veličinom čestica od 1.9  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher Scientific, USA), i koja je termostatirana na 30 °C. Mobilna faza, koja se sastoji od (A) 0.02% sirćetne kiseline i (B) acetonitrila, eluirana je prema sledećem gradijentu: 5-20% B u prvih 3 min; 20–40% B od 3 do 5 min, 40-50% B od 5 do 7.5 min, 50–60% B u periodu od 7.5-8.5 min, 60–95% B od 8.5 do 10.5 min, 95% B do 11.5 min, 95% to 5% B od 11.5 do 12 min, i na kraju 5% B do 15 min. Protok je podešen na 0.400 ml min<sup>-1</sup> a talasne dužine na  $\lambda=260$  i 320 nm. Sve analize su urađene sa rastvorima MS čistoće (Fisher Scientific UK, Leics, UK). Injekciona zapremina uzoraka je bila 10  $\mu\text{L}$ . Chromeleon softver (verzija 2.1) je korišćen za kontrolu UHPLC instrumenta.

Temperatura jonske probe (eng. vaporizer temperature) masenog spektrofotometra (TSQ Quantum Access Max triple-quadrupole mass spectrophotometer) je podešena na 300°C. Grejuća ESI proba (HESI, eng. heated electron spray ionization) je podešena na sledeće parametre: voltaža 4000 V, pritisak nosećeg gasa (N<sub>2</sub>) 28 AU (arbitrarne jedinice; eng. arbitrary units), pritisak gasa u jonskom izvoru 1.0 AU, pritisak auksilarnog gasa 10 AU, temperatura kapilare 275°C, podešavanje jonskih sočiva 0 V. Podaci sa masene spektrometrije su praćeni u negativnom modu, a za kvantifikaciju jedinjenja u uzorcima korišćen je SRM (eng. selected reaction monitoring) eksperiment. U eksperimentima fragmentacije, disocijacija molekula je indukovana kolizijom (CID, eng. collision-induced dissociation), pri čemu je energija kolizione ćelije podešena na 30 eV. Xcalibur softver (verzija 2.1) je korišćen za kontrolu instrumenta, prikupljanje i obradu podataka.

Jedinjenja su identifikovana na osnovu njihovih UV, MS i MS/MS spektara, a korišćenjem različitih standarda. Rastvori standarda su pripremljeni rastvaranjem 1 mg supstance u 1 ml metanola. Kalibracioni nivoi su dobijeni injektiranjem različitih zapremina rastvora standarda, u opsegu od 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  do 1 ng ml<sup>-1</sup>. Kvantifikacija jedinjenja je urađena na osnovu površine pikova. Rezultati su predstavljeni kao ng u 100 mg sveže mase uzorka (ng 100 mg<sup>-1</sup> SM). Standardi kafene, p-kumarinske kiseline, apigenina, luteolina, kvercitrina, izokvercitrina, izoorjentina, izoramnetina, naringenina, vanilina, rutina i kamferola su nabavljeni su od Sigma Aldrich (Germany).

### 3.6.7. Određivanje ukupnih terpenoida

Za određivanje ukupnog sadržaja terpenoida korišćena je metoda opisana u publikaciji Ghorai *et al.* (2012). U ependorfu je dodato 375  $\mu\text{L}$  hloroforma i 50  $\mu\text{L}$  ekstrakta rastvorenog u metanolu. Nakon toga, sadržaj ependorfi je promešan i ostavljen da se slegne tokom tri minuta. Naredni korak podrazumeva dodavanje 25  $\mu\text{L}$  koncentrovane sumporne kiseline, nakon čega sledi inkubacija od 2 h na sobnoj temperaturi u mraku. Po završetku inkubacije uočava se crvenkasto-braon percipitat na kontaktnoj površini ekstrakta rastvorenog u hloroformu i sumporne kiseline, što je jasan pokazatelj prisustva terpenoida. Iz ependorfi se nakon inkubacije pažljivo pipetira supernatant i odbacuje. Obojeni talog se rastvara u 375  $\mu\text{L}$  100% metanola. Po 100  $\mu\text{L}$  od svakog uzorka je pipetirano u bunarić na mikrotitracionoj ploči. Negativna kontrola (slepa proba) je 100% metanol. Apsorbanca se očitava na 538 nm pomoću čitača mikrotitracionih ploča Multiscan Sky Thermo Scientific, Finland. Za konstruisanje kalibracione krive korišćen je linalool (1 mg/mL). Ukupan sadržaj triterpenoida se izračunava iz jednačine kalibracione krive i izražava se u ekvivalentima linaloola kao mg LE/g suvog ekstrakta.

### 3.6.8. Određivanje ukupnih triterpenoida

Za određivanje ukupnog sadržaja triterpenoida korišćena je metoda opisana u Chang i saradnici (2012). U svaki bunarić na mikrotitracionoj ploči je odmereno po 10  $\mu\text{L}$  ekstrakta rastvorenih u 100% metanolu, nakon čega je dodato 15  $\mu\text{L}$  vanilin-glaacijalne kiseline (5% w/v) i 50  $\mu\text{L}$  perhlorne kiseline. Mikrotitraciona ploča se sa reakcionim smešama zagreva na 60  $^{\circ}\text{C}$  tokom 45 minuta, nakon čega se hladi na ledu do sobne temperature. Pre merenja apsorbance dodaje se 225  $\mu\text{L}$  glacijalne sirćetne kiseline. Negativna kontrola (slepa proba) je pripremljena tako da sadrži sve komponente osim uzorka, umesto koga se dodaje 100% metanol. Apsorbanca se očitava na 548 nm pomoću čitača mikrotitracionih ploča Multiscan Sky Thermo Scientific, Finland. Za konstruisanje kalibracione krive umesto ekstrakta korišćena je ursolna kiselina rastvorena u 100% metanolu. Sva merenja su ponovljena četiri puta. Ukupan sadržaj triterpenoida se izračunava iz jednačine kalibracione krive i izražava se u ekvivalentima ursolne kiseline kao mg UAE/g suvog ekstrakta.

## 3.7. Određivanje antioksidativnog kapaciteta biljaka

### 3.7.1. Određivanje antioksidativnog kapaciteta biljaka DPPH testom

DPPH test je rađen prema proceduri razvijenoj od strane Blois (1958), sa određenim modifikacijama. DPPH test meri antioksidativni kapacitet biljnog ekstrakta kao „hvatača” 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Neposredno pre eksperimenta je pripremljen svež metanolni rastvor DPPH koncentracije 40  $\mu\text{g/mL}$ . U svaki bunarić na mikrotitracionoj ploči dodato je po 20  $\mu\text{L}$  uzorka i 180  $\mu\text{L}$  radnog rastvora DPPH. Metanol u rastvoru DPPH korišćen je kao negativna kontrola. Butilisani hidroksianizol (BHA), Butilisani hidroksitoluen (BHT) i askorbinska kiselina su korišćeni kao pozitivne kontrole (referentni antioksidansi ili standardi). Negativna kontrola, uzorci i standardi su pripremljeni u triplikatu. Apsorbanca je merena nakon 30 min inkubacije u mraku, na sobnoj temperaturi, na 517 nm pomoću čitača mikrotitracionih ploča Multiscan Sky Thermo Scientific, Finland. Inhibicija DPPH radikala u prisustvu testiranog uzorka je izračunata korišćenjem sledeće formule i izražena u procentima (%):

$$\text{Inhibicija DPPH radikala (\%)} = \frac{A_{\text{sp}} - A_{\text{uz}}}{A_{\text{sp}}} * 100 \%$$

gde je  $A_{sp}$  apsorbanca negativne kontrole (bez uzorka), a  $A_{uz}$  je apsorbanca probe sa uzorkom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost procenata inhibicije DPPH radikala  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.7.2. Određivanje redukcionog potencijala

Redukcioni potencijal ekstrakata je određen po proceduri uvedenoj od strane Tusevski *et al.* (2014) sa pojedinim modifikacijama. Ova metoda se zasniva na praćenju redukcione sposobnosti ispitivanog uzorka za transformaciju  $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ , usled čega se razvija plavo-zelena boja čiji se intenzitet meri spektrofotometrijski. U reakcionu smešu je dodato 20  $\mu$ L uzorka, 40  $\mu$ L fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6) i 40  $\mu$ L rastvora kalijum-heksacijanoferata. Nakon inkubacije od 20 min na 50 °C dodato je 40  $\mu$ L rastvora trihlorsirćetne kiseline, 40  $\mu$ L destilovane vode i 8  $\mu$ L 0,1% rastvora gvožđe (III) hlorida. Negativna kontrola (slepa proba) je pripremljena na isti način kao i reakciona smeša, a umesto uzorka je dodato 20  $\mu$ L odgovarajućeg rastvarača. Apсорbanca se očitava na 700 nm nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta, pomoću čitača mikrotitracionih ploča Multiscan Sky Thermo Scientific, Finland. Redukcioni potencijal uzoraka je izražen kao  $\mu$ mol ekvivalenta askorbinske kiseline (AAE) po gramu suvog ekstrakta.

### 3.7.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti $\beta$ -karoten/linolna kiselina testom

$\beta$ -karoten/linolna kiselina test je rađen po modifikovanoj proceduri razvenoj od strane Dapkevicius *et al.* (1998). Emulzija se sastojala od rastvora  $\beta$ -karotena u hloroformu (125  $\mu$ L, 3 mg/mL) u koji je rastvorena linolna kiselina (6,25  $\mu$ L) i Tween 40 (50 mg). Dodaje se 125  $\mu$ L hloroforma u smešu. Nakon rastvaranja, hloroform je uparen korišćenjem rotacionog evaporatora (Buchi rotavapor R-114) na 40 °C, a suvi ostatak je rastvoren pomoću 25 mL destilovane vode. Ekstrakti i standardi BHA, BHT i askorbinska kiselina su pripremljeni u triplicatu. U svaki bunarić na mikrotitracionoj ploči je dodato po 200  $\mu$ L emulzije i 28  $\mu$ L test supstance (ekstrakta/standarda/100% metanola). Apсорbanca je merena na 490 nm neposredno nakon dodavanja uzorka i reagensa ( $t = 0$  minuta) i dva sata nakon inkubacije na 50 °C ( $t = 120$  minuta), pomoću čitača mikrotitracionih ploča Multiscan Sky Thermo Scientific, Finland. Antioksidativna aktivnost uzoraka je određena praćenjem inhibicije gubitka boje  $\beta$ -karotena, korišćenjem sledeće jednačine:

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_{120} - C_{120}) / (C_0 - C_{120})] \times 100$$

gde su  $A_{120}$  i  $C_{120}$  apsorbanca merene u  $t = 120$  minuta za uzorke i kontrolu (slepu probu), respektivno, dok je  $C_0$  apсорbanca kontrole u  $t = 0$  minuta. Dobijene vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost iz tri ponavljanja  $\pm$  standardna greška.

## 3.8. Analiza sadržaja šećera i šećernih alkohola HPLC - PAD metodom

Po 20 mg svakog uzorka je ekstrahovano sa po 1 ml metanola i inkubirano tokom 1 sata. Supernatant koji je dobijen nakon centrifugiranja tokom 15 minuta brzinom 13000  $g^{-1}$ , korišćen za dalje analize šećera u uzorku.

Rastvorljivi šećeri su identifikovani i kvantifikovani metodom tečne hromatografije pod visokim pritiskom sa pulsnom amperometrijskom detekcijom (HPLC-PAD). Koncentracije glukoze, fruktoze i saharoze su preračunate na osnovu površine njihovih pikova, a kao standardi su korišćene čiste supstance (Sigma Co. St. Luis, MO). Analize su urađene Waters Breeze hromatografskim sistemom (Waters, Milford, MA), koji je snabdeven elektrohemijskim detektorom (Waters 2465) sa zlatnom random elektrodom prečnika 3 mm i vodoničnom referentnom elektrodom. Za mobilnu fazu

korišćen je 0.2 M NaOH. Za pripremanje 0.2 M rastvora NaOH korišćen je rastvor NaOH (50% w/w, sa niskom sadržajem karbonata, J.T. Baker, Deventer, Holandija) i dejonizovana voda. Razdvajanje šećera je izvršeno korišćenjem CarboPac PA1 (Dionex, Sunnyvale, CA) kolone (250 x 4 mm) koja je povezana sa odgovarajućom CarboPac PA1 predkolonom.

Šećeri su eluirani tokom 20 minuta, pri protoku od  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , na konstantnoj temperaturi od  $30^\circ\text{C}$ . Signali su detektovani u pulsnom modu sa sledećim oblikom signala: E1= + 0.05 V tokom 400 ms; E2= + 0.75 V tokom 200 ms; E3= - 0.15 V tokom 300 ms i u okviru 180 ms integrativnog vremena. Vremenska skala filtera je 0.2 s i opseg od 200 – 500 nA za celu mV skalu. Analize za svaki uzorak su urađene u tri ponavljanja. Vrednosti su izražene u jedinicama mmol šećera na 100g suve mase. Korišćeni su sledeći standardi: arabinoza, glukoza, fruktoza, riboza, galaktoza, ksiloza, saharoza, maltoza, trehaloza, turanoza, gentiobioza, izomaltoza, melibioza, izomaltotrioza, maltotrioza, panoza, rafinoza, stahioza, manitol, eritritol, galaktitol, glicerol i sorbitol.

### 3.9. Detekcija reaktivnih oblika kiseonika

Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija (EPR) ili elektronska spinska rezonantna spektroskopija je metod korišćen za detekciju i kvantifikaciju slobodnih radikala u celim biljkama kod tri ispitivane vrste.

Kako bi se omogućilo snimanje kiseoničnih slobodnih radikala, superoksid radikala ( $\text{O}_2^-$ ) i hidrosil radikala ( $\cdot\text{OH}$ ), primenjuje se posebna tehnika za “hvatanje spinova” poznatija pod nazivom “spin-trap” tehnika. Ova tehnika podrazumeva korišćenje dijamagnetnih supstanci koje reaguju sa radikalima pri čemu se formiraju radikalski adukti, koji su stabilniji u odnosu na radikale posredstvom kojih nastaju. Ovi proizvodi su dužeg poluživota i mogu se efikasno analizirati pomoću EPR spektrometrije. EPR spektri koji se dobijaju pružaju informaciju o količini radikala kao i o tipu radikala u datom uzorku. Kao spin-trap je korišćen DEPMPO (5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin-N-oksidi), koji daje stabilne radikalske adukate, a najveća prednost je selektivnost prema hidrosilnim radikalima.

Sva merenja su vršena na svežem biljnom materijalu odmah nakon završetka eksperimenta. Po 100 mg svežeg biljnog materijala je postavljano u specijalizovanu kvarcnu pljosnatu kivetu prilagođenu za snimanje signala na čvrstim uzorcima tzv. “Tissue Cell” (debljina 2 mm, dužina 50 mm; Wilmad LabGlass, Canada). Uzorci su prekrivani gas-propusnom pločicom kako se ne bi uticalo na prisustvo kiseonika u uzorku. Zatim se uzorci postavljaju u posebne nosače na aparatu i pokreće se snimanje EPR signala. Nakon završetka snimanja signala iz uzorka postavljenog u kvarcni “tissue cell”, dodaje se 10  $\mu\text{l}$  spin-trapa DEPMPO koncentracije 30 mM u svež biljni materijal, nakon čega se EPR signal ponovo snima. Ovakva dva signala se upoređuju, a signali snimljeni iz uzorka bez spin-trapa predstavljaju kontrolne uzorke.

EPR signali su snimani tokom 30 minuta u 20 ciklusa, a parametri snimanja EPR spektara su podešeni prema ranije ustanovljenom protokolu (Mojović *et al.* 2005a). Merenja su vršena na sobnoj temperaturi na ELEXSYS-II E540 EPR aparatu (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Germany) koji radi u X-oblasti gde sa centrom polja od 3500 G (0,35T). Kao izvor mikrotalasnog zračenja je korišćen klistron, sa snagom miktotalasa od 10 mW, frekvencijom mikrotalasa od 9,85 GHz i modulacionom amplitudom od 2 G. Signali EPR snimanja se dobijaju na ekranu kompjutera u formi xy-grafika. Kompjuterski softver koji je korišćen je Xepr (Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Germany) omogućava fino podešavanje i kalibracije uređaja i konstantno praćenje signala određenog uzorka.

Pored hidroksilnih i superoksidnih signala, mereni su i EPR signali hidrokinonske strukture i askorbil radikala.

Obrada EPR signala je vršena u programu ELEANA 1.4.0.1. (Larida, Jordanów, Poland), gde se preračunava količina detektovanog radikala u odnosu na signale kontrole. Pošto je korišćen biljni materijal mahovina čiji sadržaj vode umnogome varira, koncentracija 'OH i O<sub>2</sub>' preračunata je na suhu masu koja je izmerena 7 dana nakon merenja EPR signala.

### **3.10. Histoheмиjska analiza odabranih grupa јединjenja**

Histoheмиjska analiza podrazumeva analizu različitih grupa јединjenja u ispitivanom uzorku korišćenjem specifičnih boja. Specifične boje se vezuju za određene grupe јединjenja u ćelijama i tkivima i menjaju boju, što se može detektovati svetlosnim mikroskopom. Mikroskopske tehnike omogućavaju detekciju јединjenja, njegovu lokalizaciju u ćelijama i tkivima i kvalitativni opis. Za analizu biljaka gajenim u eksperimentima korišćene su boje koje služe za dokazivanje prisustva fenolnih јединjenja (FeCl<sub>3</sub>), lipida (*Sudan Black B*), terpena (*NADI* reagens) i šećera (*Schiff* reagens).

Vrste mahovina korišćenje u eksperimentima su veoma nežne i sitne, pa stoga ne postoji mogućnost da se prave poprečni preseци korišćenjem mikrokriotoma. Dodatni problem predstavljaju njihovi јednoslojni filoidi, tako da se za sve vrste histoheмиjskih analiza pravi klasični svež preparat. Mora se voditi računa da se tkivo pri samom bojenju ne povredi, da ne bi došlo do ulaska boje u oštećene ćelije i posledičnog dobijanja lažno pozitivnog rezultata. Preparati se fiksiraju u destilovanoj vodi i pošto veoma brzo gube vodu, neophodno je povremeno dodavati destilovanu vodu na biljke. Pripremljeni preparati za sve vrste histoheмиjskog bojenja su posmatrani i dokumentovani svetlosnim mikroskopom tipa AxioVision 4.8.2 (SPS Zeiss, Göttingen, Germany).

#### **3.10.1. Određivanje fenolnih јединjenja UV – autofluorescencijom**

Korišćen je svež preparat mahovina fiksiran u kapi destilovane vode. Na fluorescentom mikroskopu preparati su posmatrani pod UV lampom i ukoliko postoje određena јединjenja, uočava se fluorescencija. Za ovakvo snimanje potrebno je da UV lampa bude zagrejana i da u prostoriji bude mrak. U zavisnosti od boje uočene fluorescencije može se potvrditi tip јединjenja. Fluorescencija se može uočiti kao sijanje crvene, plave, ljubičaste boje i sličnih nijansi, ali i svetleće žuto-zelene. Tkiva koja poseduju flavonoide autofluoresciraju žuto, tamno žuto, zeleno ili retko plavo pod UV svetlosti od 365 nm. Prema dostupnim podacima iz literature, plava fluorescencija se javlja i kada su prisutna fenolna јединjenja i kumarini (Wagner & Bladt, 1996; Combrinck *et al.* 2007).

#### **3.10.2. Određivanje fenolnih јединjenja reakcijom sa FeCl<sub>3</sub>**

Feri-hlorid boja napravljena je kao 10% rastvor FeCl<sub>3</sub> sa dodatkom minimalne količine natrijum karbonata u destilovanoj vodi. Procedura prema Johansen-u (1940) podrazumeva da se cele biljke nakon isteka eksperimenta potope u rastvor FeCl<sub>3</sub> gde se drže tokom 15 minuta. Nakon toga, biljke se ispiraju dobro destilovanom vodom dva puta. Preparati se fiksiraju na mikroskopskoj pločici u destilovanoj vodi. Kontrola za ovaj tip bojenja predstavljaju biljke potopljene u destilovanu vodu.



### 3.10.3. Određivanje terpena reakcijom sa *NADI* reagensom

*NADI* reagens se najčešće koristi za bojenje etarskih ulja i terpena. Zbog svoje sposobnosti da oksiduje i menja boju u zavisnosti od pH, *NADI* reagens omogućava razlikovanje plavo obojenih etarskih ulja i intezivno obojenih crvenih i ljubičastih kiselih smola i kiselih terpena. Etarska ulja i smole su obično smeše različitih tipova terpenoidnih jedinjenja. Monoterpeni i seskviterpeni su ispraljiva jedinjenja koja su karakteristična komponenta etarskih ulja, pa se stoga mogu uočiti kao plave strukture u posmatranim preparatima. Neisparljive komponente kao što su diterpeni i triterpeni su karakteristična komponenta smola i mogu se uočiti kao nijanse crvene i ljubičaste boje na preparatima.

*NADI* reagens se pravi tako što se sjedine po 0,5 ml od dva rastvora: 1% alfa naftola rastvorenog u 40% etanolu i 1% N,N-dimetil-p-fenilenediamin u HCl rastvoren u vodi. Ova smeša rastvora se dodaje u 49 ml 0,05M natrijum-fosfatnog pufera (pH=7,2). Protokol za *NADI* bojenje podrazumeva pravljenje kontrolnih uzoraka na isti način kao i za *Sudan Black B*, odnosno, inkubaciju biljaka u smeši metanol:hloroform:voda:HCl = 66:33:4:1 tokom 3 sata zavijene u mraku. Kontrolne biljke se nakon isteka vremena tretiraju bojom prema protokolu na isti način kao i ostale biljke (David & Carde 1964). Nakon eksperimenata biljke se potapaju u *NADI* reagens gde se inkubiraju tokom 1 sata na sobnoj temperaturi zavijene u foliju. Povremeno se mučkaju u tečnosti kako bi boja doprla do svih delova biljke podjednako. Nakon sat vremena biljke se ispiraju sa 0,1M natrijum-fosfatnim puferom oko 2 minuta. Nakon ispiranja biljke se fiksiraju u destilovanoj vodi i posmatraju na svetlosnom mikroskopu.

### 3.10.4. Određivanje lipida reakcijom sa *Sudan Black B* bojom

*Sudan* boje služe za bojenje ukupnih masti, ulja, voskova, slobodnih masnih kiselina, fosfolipida. Reakcija koje se vizuelizuje na mikroskopu usled vezivanja boje za pomenute ćelijske komponente se kreće od plave do crne boje. Pored toga, može se obojiti i kutin, polimeri masnih kiselina i hidroksimasnih kiselina.

*Sudan black B* boja se pravi rastvaranjem 0,7 g boje u 100 ml 70% etanola. Boja se profiltrira i čuva u tamnoj boci kako ne bi došlo do fotooksidacije. Sama procedura po Jensen-u (1962) podrazumeva tretiranje celih biljaka iz eksperimenta sa 50% etanolom tokom 3 minuta. Nakon toga se preparati 20 minuta tretiraju bojom u zatamljenim ependorfama. Nakon inkubacije sa bojom, biljke se ponovo ispiraju 1 minut sa 50% etanolom. Nakon ispiranja preparati se fiksiraju u destilovanoj vodi. Kontrola za ovu metodu predstavlja biljke koje su 3 sata inkubirane u smeši metanol:hloroform:voda:HCl = 66:33:4:1 u mraku. Nakon isteka vremena kontrolne biljke se ispiraju 50% etanolom i dalje provlače kroz boju prema navedenom protokolu.

### 3.10.5. Određivanje polisaharida *PAS* reakcijom

*PAS* (eng. Periodic Acid - Schiff) reakcija služi za detektovanje različitih polisaharida koji poseduju slobodne aldehidne veze, zatim skroba koji ima 1,2-diglikolne veze i sličnih šećera. Koristi se boja zvana Šifov reagens i specifično se uočava crveno obojenje hloroplasta, ćelijskih zidova ili membrana, dok citoplazma ostaje neobojena.

Šifov reagens je napravljen kao rastvor 1 g baznog fuksina rastvorenog u 200 ml ključale destilovane vode. Nakon što se rastvor prohladi na 50°C, on se filtrira i dodaje se 20 ml 1N hlorovodonične kiseline. Nakon što se rastvor ohladi na 25°C dodaje se 1 g natrijum metabisulfata



( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ). Rastvor je čuvan u tamnoj boci 24h na sobnoj temperaturi. Pred korišćenje u reagens se dodaje 2 g aktivnog uglja i mućka tokom 1 min. Rastvor treba da bude žućkast-bezbojan. Pre upotrebe boja se profiltrira i čuva se u frižideru.

Prema Jensen (1962), *PAS* reakcija podrazumeva oksidaciju 1% perjodnom kiselinom u prvom koraku tokom 10 minuta. Nakon toga biljke se ispiraju tekućom vodom tokom 10 minuta. Naredni korak podrazumeva potapanje biljaka u Šifov reagens u trajanju od 30 minuta, uz povremeno mućkanje. Nakon delovanja reagensa sledi kratko ispiranje destilovanom, a onda reakcija sa 2%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  tokom 1-2 minuta. Na kraju se preparati ispiraju tekućom vodom dok ne postanu crveni. Kao takvi, preparati se fiksiraju se u destilovanoj vodi. Kontrolni uzorci za ovu metodu se ne tretiraju perjodnom kiselinom, dok su svi ostali koraci bojenja identični.

### **3.11. Statistička obrada podataka**

Statistička obrada rezultata je vršena u programu STATISTICA8. Korišćena je ANOVA za analizu varijanse podataka i Fisherov LSD post-hoc test za poređenja između srednjih vrednosti, sa nivoom statističke značajnosti od  $p \leq 0,05$ . Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je uz pomoć programa Microsoft Office Excel, na kojima su vertikalnim linijama prikazane vrednosti standardne greške, a slovima rezultati Fisher-ovog LSD testa. Prikazani rezultati su srednje vrednosti dobijene na osnovu tri ponavljanja.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza morfofenetskih parametara

Preživljavanje kao osnovni parametar reakcije na sredinske uslove govori o stepenu stresa u kome se neki organizam nalazi. Morfofenetski parametri su praćeni za odabrane vrste mahovina u uslovima stresa izazvanog povećanim prisustvom NaCl. Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih u tabeli 3, zapaža se smanjenje procenta preživelih biljaka kod sve tri vrste mahovina sa povećanjem koncentracije NaCl u eksperimentu I. U kontrolnoj grupi biljaka preživljavanje je maksimalno kod svih ispitivanih vrsta, kao i u prisustvu niske koncentracije NaCl (10 mM). Dodatkom 50 mM NaCl, preživljavanje opada sa 100 % na 93,40 % kod brio-halofite *H. heimii*, dok je kod vrsta *E. hungaricus* i *P. patens* u istoj postavci preživljavanje maksimalno. Generalno, sa daljim povećanjem koncentracije NaCl, uočava se znatno smanjenje procenta preživelih biljaka kod sve tri vrste. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 100 mM i 250 mM NaCl, najveći procenat preživljavanja zabeležen je za vrstu *E. hungaricus*, a najmanji za *H. heimii*. Međutim, zanimljivo je da je na najvišoj primenjenoj koncentraciji od 500 mM, procenat preživljavanja najveći za nehalofitnu mahovinu *P. patens*, dok druge dve testirane brio-halofitne vrste preživljavaju u znatno manjem procentu. Kod sve tri ispitivane vrste uočava se trend linearnog pada procenta preživelih biljaka, sa glavnom razlikom u ukupnom broju preživelih biljaka. Naime, najviše biljaka preživljava dugotrajni stres izazvan sa NaCl kod vrste *P. patens*. Pored toga, bitno je istaći da postoji značajan broj preživelih biljaka i na najvišoj primenjenoj koncentraciji NaCl (500 mM), što ukazuje na potencijalno dobru prilagođenost ovih vrsta, preživljavanje i opstanak u stresu izazvanom solima.

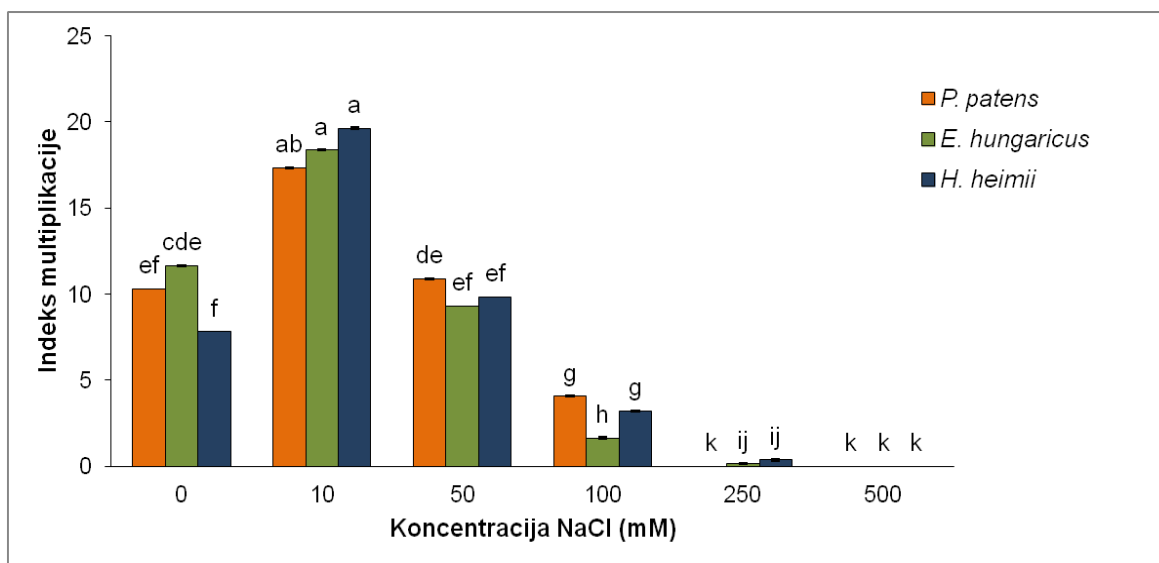
Tabela 3. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na procenat preživljavanja kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I

Koncentracija NaCl (mM)	<i>P. patens</i>	<i>E. hungaricus</i>	<i>H. heimii</i>
0	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00
10	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00
50	100 ± 0,00	100 ± 0,00	93,40 ± 0,62
100	98,01 ± 0,50	98,42 ± 0,40	93,36 ± 1,00
250	77,04 ± 0,13	82,26 ± 0,56	75,71 ± 1,29
500	62,75 ± 0,17	11,76 ± 1,06	10,94 ± 1,02

Sa druge strane, ukoliko se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50  $\mu$ M ABA kao u eksperimentu II, sve biljke preživljavaju, bez obzira na povećanje koncentracije NaCl u hranljivoj podlozi. Zabeleženo je preživljavanje od 100 % za svaki tretman kod sve tri ispitivane vrste, što ukazuje da predtretman apscisinskom kiselinom značajno utiče na povećanje sposobnosti preživljavanja stresa izazvanog dodatkom NaCl.

Indeks multiplikacije (IM) predstavlja broj novoformiranih izdanaka ili jasno izdvojenih pupoljaka sa pojedinačnog eksplantata, koji omogućava praćenje promena u rastenu i razviću biljaka u uslovima stresa. Na osnovu rezultata prikazanih na grafiku 1, uočava se da kod svih ispitivanih vrsta

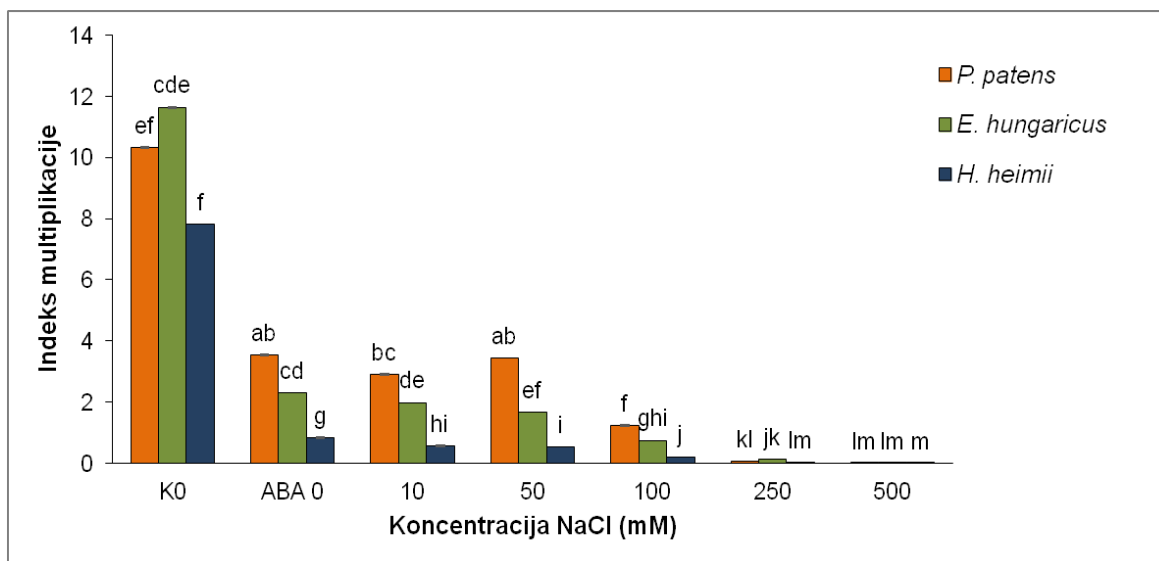
niske koncentracije egzogeno dodatog NaCl (10 mM) utiču na povećanje IM u odnosu na kontrolu. Ova pojava je posebno izražena kod brio-halofite *H. heimii*, kod koje je broj novoformiranih izdanaka dvostruko veći u tretmanu sa dodatkom 10 mM NaCl nego u kontrolnoj grupi. Sa daljim povećanjem koncentracije NaCl, sve tri vrste odlikuje smanjenje IM. Biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl pokazuju sličan trend formiranja izdanaka kao i one u kontrolnoj grupi. Međutim, IM se značajno smanjuje već kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 100 mM NaCl. Na visokim koncentracijama (250 mM) je zabeleženo sporadično formiranje novih pupoljaka isključivo kod brio-halofitnih vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*, dok na najvišoj primenjenoj koncentraciji NaCl (500 mM) nije bilo moguće uočiti nove izdanke. Smanjenje formiranja novih izdanaka je očekivano, s obzirom na to da povećane koncentracije NaCl deluju inhibitorno na rastenje i razviće biljaka.



Grafik 1. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na indeks multiplikacije kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I. (Slova prikazana na grafiku opisuju značajnost razlika između vrsta i između tretmana primenom Fisher-ovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ )).

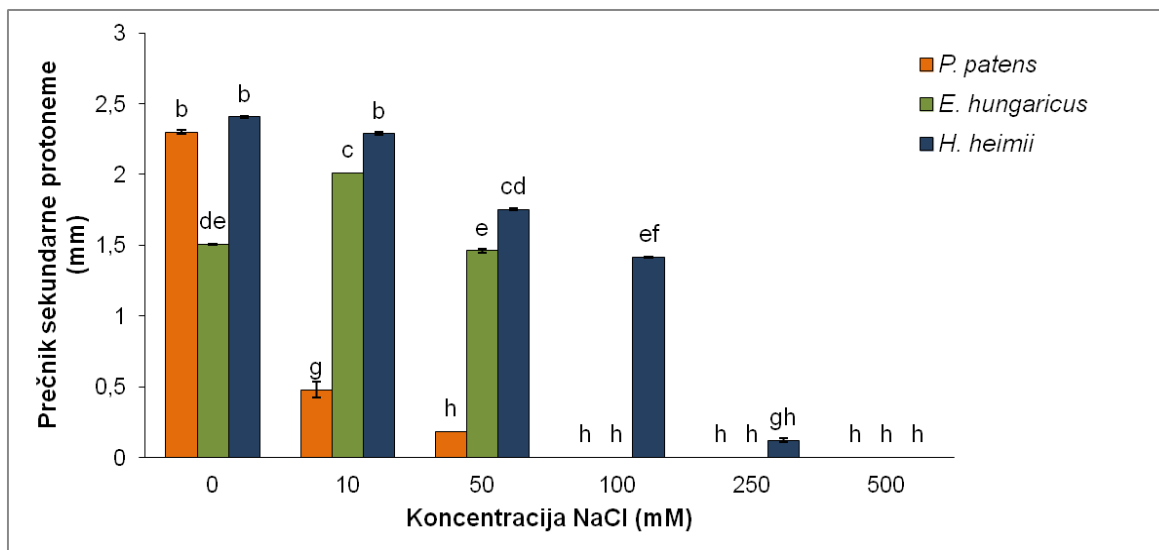
Egzogeno primenjena ABA značajno utiče na smanjenje IM kod sve tri vrste mahovina u odnosu na kontrolnu grupu u eksperimentu II (Grafik 2). Trend smanjenja broja novoformiranih izdanaka je isti za sve ispitivane vrste. Ukoliko se biljke predtretirane ABA gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom niskih koncentracija NaCl, zapaža se da nema značajne promene u IM. Na osnovu dobijenih rezultata uočava se da biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 10 i 50 mM NaCl uz dodatak ABA sporadično formiraju nove izdanke. Sa daljim povećanjem koncentracije NaCl uz dodatak ABA, trend opadanja IM je sličan kao i u eksperimentu I (grafik 1).

Evidentno je da egzogeno dodata ABA inhibira ili usporava formiranje novih pupoljaka kod sve tri ispitivane vrste i u svim tretmanima. Pored toga, najveći IM je zabeležen kod *P. patens* u oba tipa eksperimenta. Među brio-halofitama *E. hungaricus* i *H. heimii* postoji razlika u IM. U eksperimentu I, IM je približno isti za obe vrste, ali sa povećanjem koncentracije NaCl, *H. heimii* formira neznatno više novih pupoljaka u odnosu na vrstu *E. hungaricus*. Međutim, u eksperimentu II, nakon dodavanja ABA, *E. hungaricus* u svim tretmanima formira više novih pupoljaka od *H. heimii*, što može ukazivati da ove dve vrste drugačije reaguju na egzogenu ABA, ali i posledično na stres izazvan solima.



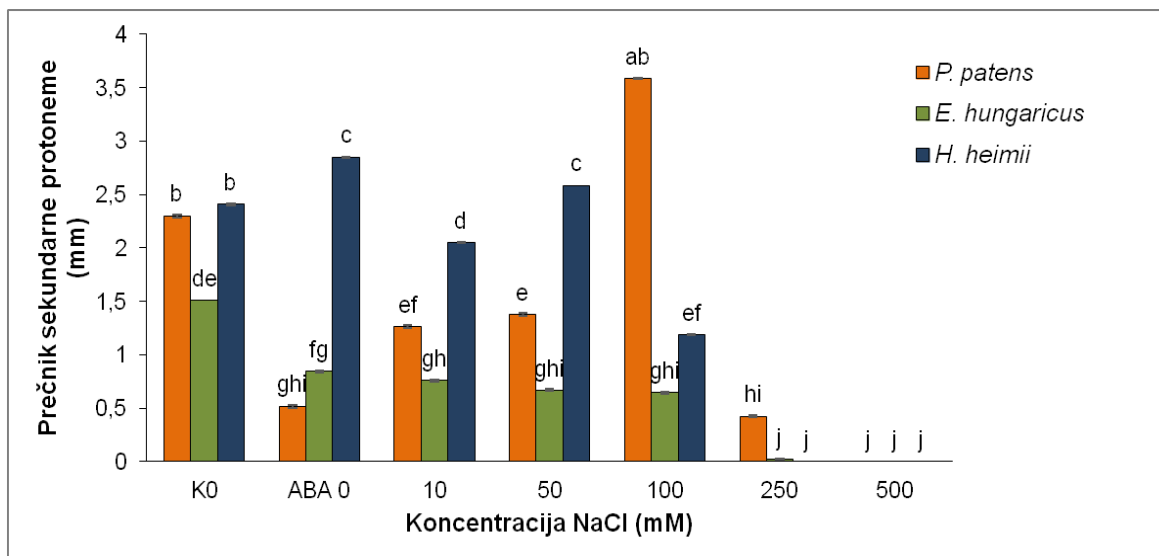
Grafik 2 . Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na indeks multiplikacije kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II (K0- nulta kontrola; ABA 0 – biljke tretirane samo sa ABA). (Slova prikazana na grafiku opisuju značajnost razlika između vrsta i između tretmana primenom Fisher-ovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ )).

Značajan morfofenetski parametar je prečnik sekundarne protoneme. Rezultati prikazani na grafiku 3 pokazuju da kod vrste *P. patens* prečnik protoneme znatno opada sa povećanjem koncentracije NaCl. Najmanji prečnik protoneme za ovu vrstu je zabeležen kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, dok sa dodatkom viših koncentracija u hranljivu podlogu (100, 250 i 500 mM) sekundarna protonema nije uočena. Kod brio-halofitnih vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*, dobijeni su drugačiji rezultati. Povećanje prečnika protoneme se uočava na 10 mM NaCl kod vrste *E. hungaricus*, dok na 50 mM NaCl vrednost neznatno opada. Uočava se da ni *E. hungaricus* ne formira sekundarnu protonemu sa daljim povećanjem koncentracije soli kao ni *P. patens*. Sa druge strane, kod vrste *H. heimii* su zabeležene najveće vrednosti prečnika sekundarne protoneme, kod koje i na 250 mM NaCl pojedine biljke imaju sposobnost da formiraju sekundarnu protonemu.



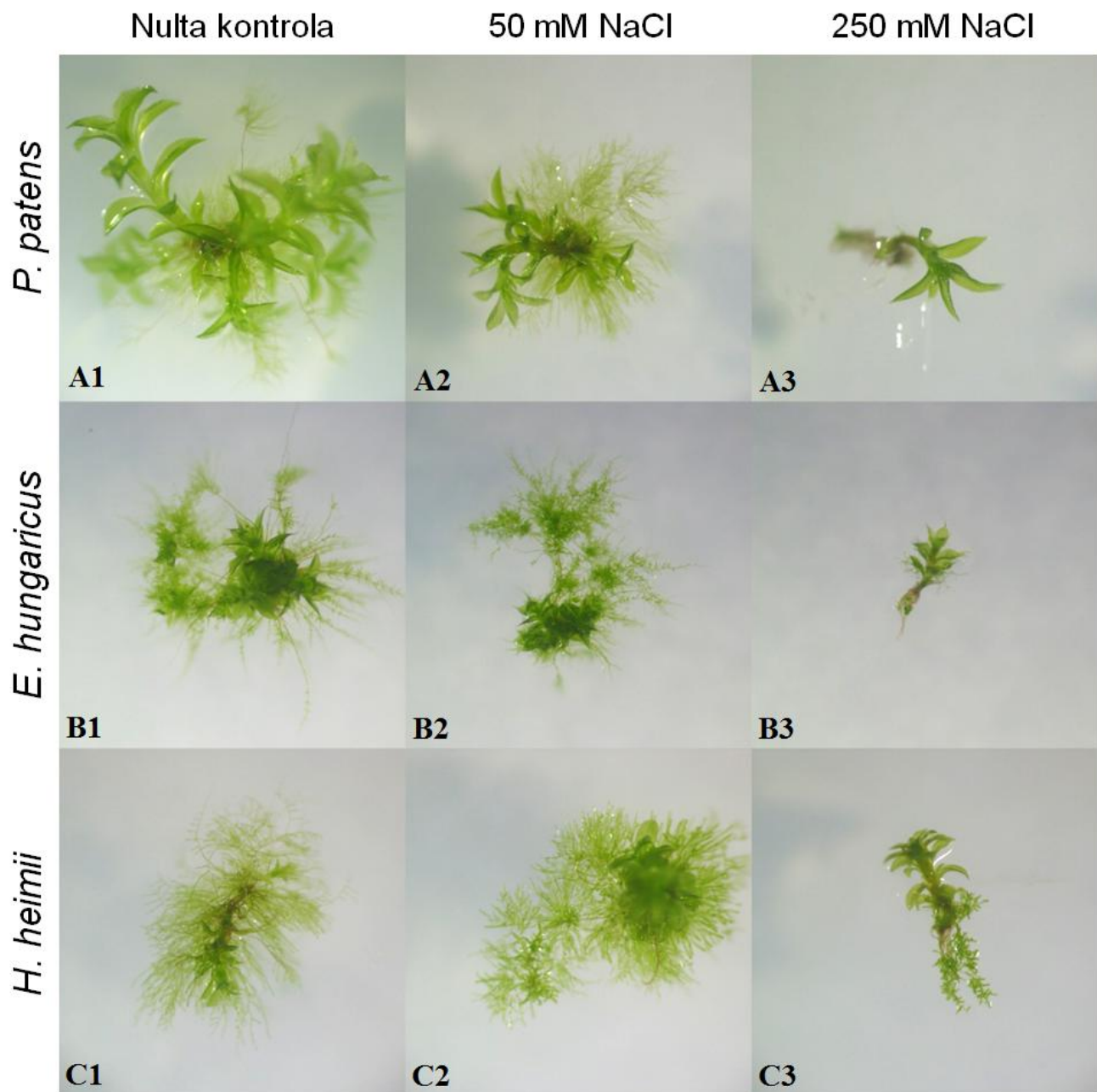
Grafik 3. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na prečnik sekundarne protoneme kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I. (Slova prikazana na grafiku opisuju značajnost razlika između vrsta i između tretmana primenom Fisher-ovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ )).

U eksperimentu II, trend promene prečnika sekundarne protoneme (grafik 4) se razlikuje od trenda koji je dobijen za IM (grafik 2). Sekundarna protonema se razvija kod kontrolnih biljaka u oba tipa eksperimenta. Ono što je zanimljivo je da *H. heimii* ima veći prečnik protoneme nakon tretmana ABA nego u nultoj kontroli (K0). Očekivano je da *H. heimii* ima najviše vrednosti prečnika protoneme, kao što je zapaženo u eksperimentu I. Međutim, sekundarna protonema nije zabeležena kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 ili 500 mM NaCl uz dodatak 50  $\mu$ M ABA. Sa druge strane, vrsta *E. hungaricus* u manjoj meri formira protonemu nakon tretmana ABA. Kod ove vrste se uočava formiranje sekundarne protoneme i na koncentracijama NaCl višim od 50 mM, što nije bio slučaj u eksperimentu I (grafik 2). Vrsta *P. patens* ima veće vrednosti prečnika sekundarne protoneme u eksperimentu II, slično vrsti *E. hungaricus*. Egzogeno ABA utiče na smanjenje prečnika protoneme kod *P. patens*. Dodavanjem ABA u hranljivu podlogu sa različitim koncentracijama NaCl (10-100 mM), dolazi do linearnog rasta prečnika sekundarne protoneme. Na koncentraciji od 500 mM NaCl nije zabeležena protonema ni kod jedne ispitivane vrste. Generalno, na ekstremno visokim koncentracijama od 250 i 500 mM preživljavaju sve vrste ukoliko se predtretiraju ABA, ali nisu sposobne da formiraju nove pupoljke i sekundarnu protonemu.



Grafik 4. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na indeks multiplikacije kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II (K0- nulta kontrola; ABA 0– biljke tretirane samo ABA). (Slova prikazana na grafiku opisuju značajnost razlika između vrsta i između tretmana primenom Fisher-ovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ )).

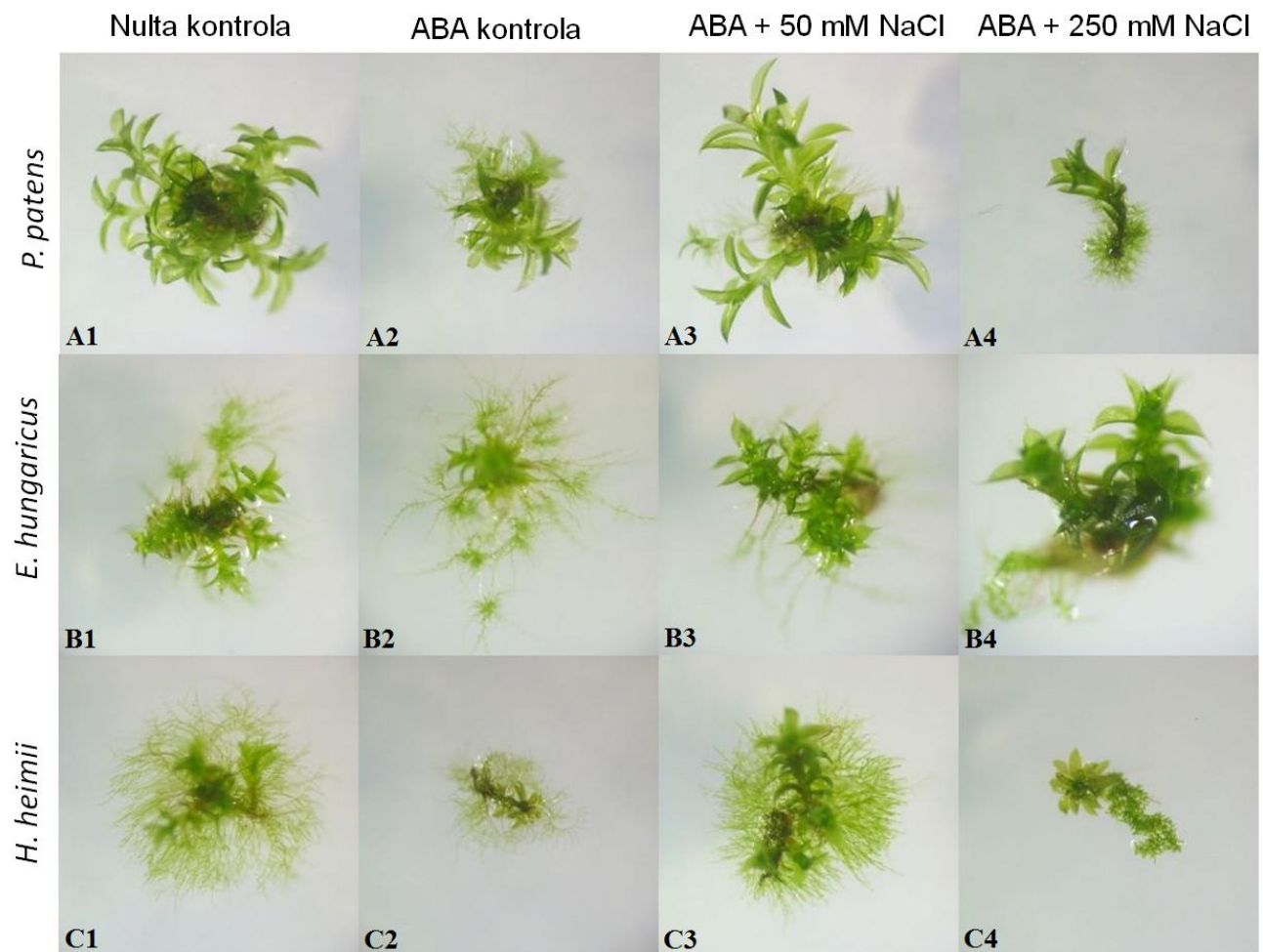
Morfogenetiski parametri su praćeni i fotografisani pod lupom za eksperiment I (Slika 18) i eksperiment II (Slika 19). Vrsta *P. patens* razvija najveći broj novih pupoljaka i izdanaka u poređenju sa halofitnim vrstama, ali ne razvija puno protonemalnih konaca *in vitro* (Slika 18, A1). Brio-halofitne mahovine gajene u uslovima *in vitro* su generalno manjeg rasta u odnosu na *P. patens* gajene u istim uslovima i produkuju manji broj novih izdanaka. Međutim, razviće sekundarne protoneme je intenzivno kod vrste *E. hungaricus* (Slika 18, B1) i *H. heimii* (Slika 18, C1). Razlike između ove dve brio-halofite su evidentne. Naime, *E. hungaricus* produkuje više izdanaka (grafik 1), ali manje protoneme u poređenju sa *H. heimii*, koja razvija masivnu protonemu (grafik 3), ali manje novih pupoljaka i izdanaka (Slika 18).



Slika 18. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na morfogenezu kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I zabeležen na lupi. (Uvećanje 2x za sliku A1; uvećanje 1,6x za slike od A2-C3). A) *P. patens*: A1 – kontrolna grupa biljaka, A2 – 50 mM NaCl, A3 – 250 mM NaCl; B) *E. hungaricus*: B1 – kontrolna grupa biljaka, B2 - 50 mM NaCl, B3 – 250 mM NaCl; C) *H. heimii*: C1 – kontrolna grupa biljaka, C2 - 50 mM NaCl, C3 – 250 mM NaCl.

Protonema se manje intenzivno grana i raste kod biljaka tretiranih ABA u eksperimentu II, što je posebno uočljivo kod vrste *H. heimii* (Slika 19, C2). Egzogeno dodata ABA utiče na smanjenje broja novoformiranih izdanaka kod sve tri vrste mahovina, što je evidentno na slici 19 (A2, B2, i C2). Sve morfogenetske promene prikazane na slici 19 su u skladu sa rezultatima predstavljenim na graficima 1, 2, 3 i 4 i dodatno opisuju veličinu i brojnost biljaka u određenim tretmanima.



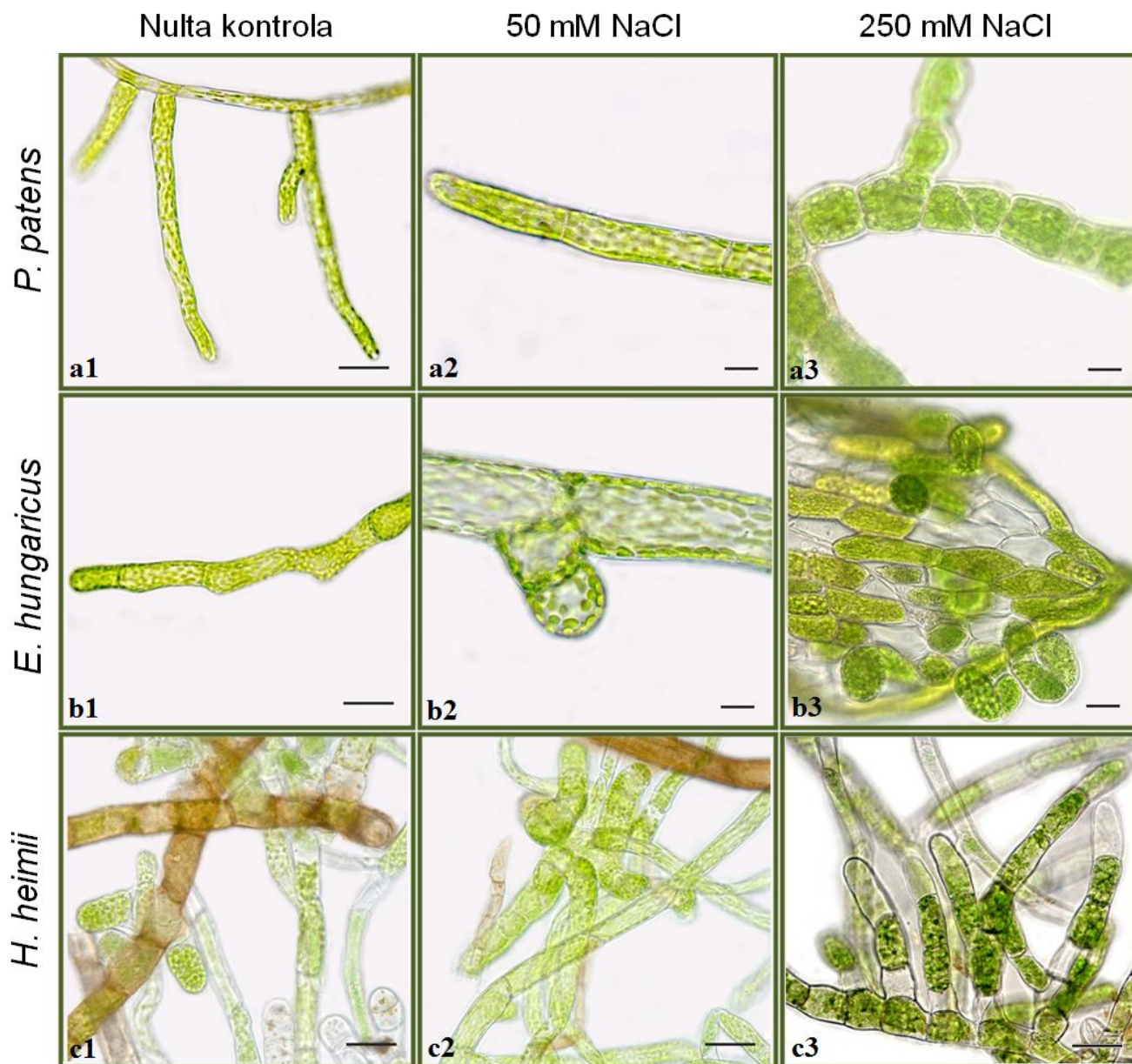


Slika 19. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na morfogenezu kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II zabeležen na lupi. (Uvećanje 2x za B4: Uvećanje 1,6x za sve ostale). A) *P. patens*: A1 – kontrolna grupa biljaka (K0), A2 – biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50  $\mu$ M ABA (ABA 0); A3 – 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl, A4 – 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl; B) *E. hungaricus*: B1 – kontrolna grupa biljaka (K0), B2 – ABA kontrola; B3 – 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl, B4 – 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl; C) *H. heimii*: C1 – kontrolna grupa biljaka (K0), C2 – ABA kontrola; C3 – 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl, C4 – 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl.

Za razliku od morfogenetskih parametara dokumentovanih na lupi (slika 18 i 19), detaljnije promene na morfo-anatomskom nivou kod biljaka gajenih u obe eksperimentalne postavke se mogu uočiti uz pomoć svetlosnog mikroskopa (Slika 20 i 21). Sve tri ispitivane vrste u kontrolnoj grupi razvijaju normalnu protonemu, sa pravilno razvijenom hloronemom i kaulonemom, bez uočljivih brahicita i tmema ćelija (Slika 18 a1, b1 i c1). Ukoliko se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl tokom tri nedelje, zapaža se da *H. heimii* intenzivno razvija gustu, isprepletanu protonemu (Slika 20, c2), dok *P. patens* i *E. hungaricus* razvijaju normalne hloronemalne filamente. Međutim, visoke koncentracije NaCl (250 mM) dovode do značajnih promena u morfo-anatomiji sve tri ispitivane vrste mahovina (Slika 20, a3, b3 i c3). Kod *P. patens* se zapaža proces izduživanja hloronemalnih ćelija i zadebljavanje ćelijskog zida, što vodi ka formiranju brahicita (Slika 20, a3). Kod vrste *E. hungaricus* tretirane sa 250 mM NaCl nije zapaženo formiranje protoneme, pa stoga nije dokumentovano formiranje brahicita. Međutim, zanimljivo je da se na filoidima formiraju novi pupoljci slični gemama drugih vrsta, što može da ukazuje na posebnu strategiju preživljavanja na visokim



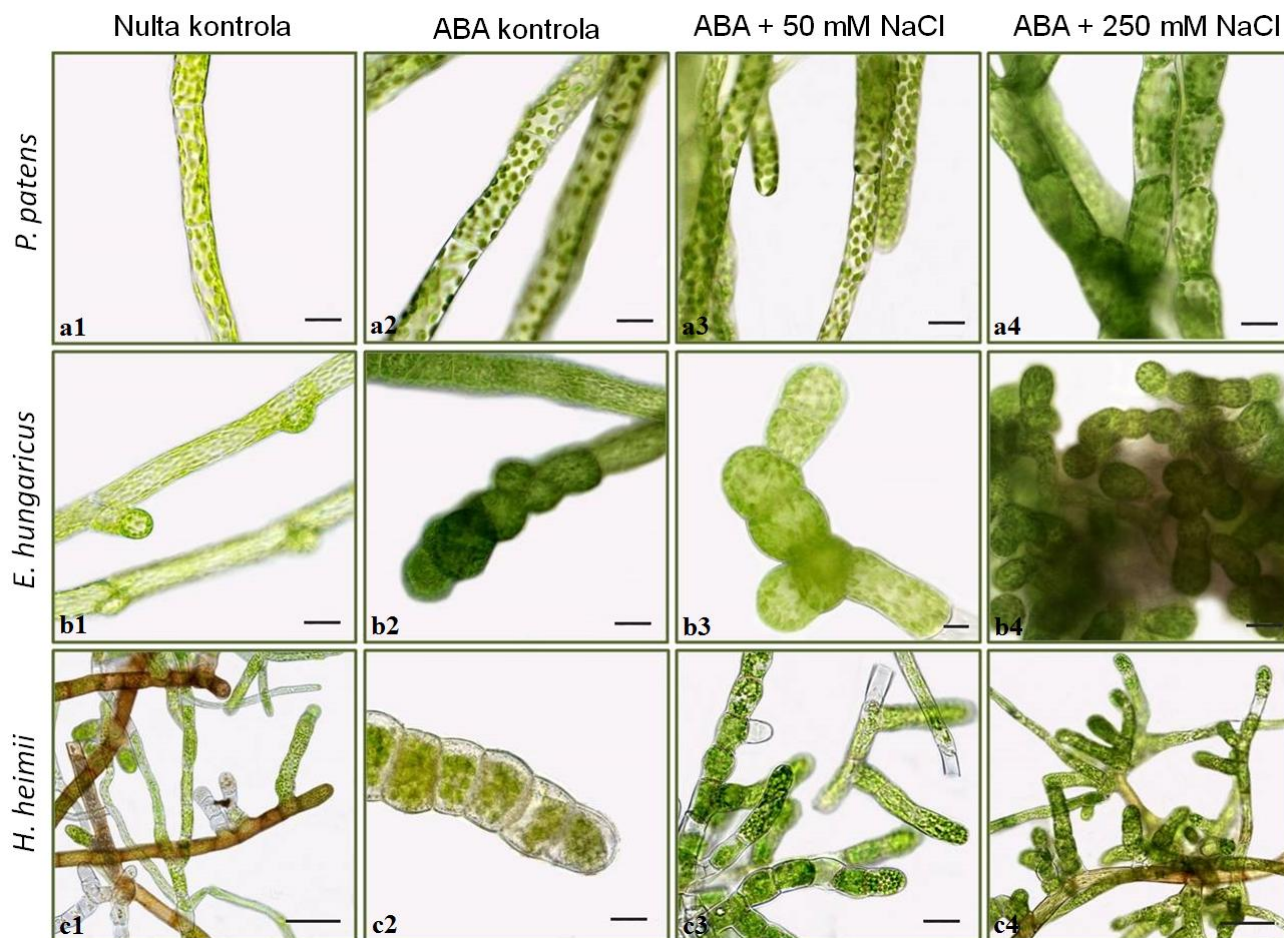
koncentracijama soli (Slika 20, b3). Sa druge strane, *H. heimii* intenzivno formira tmema ćelije, a zapaženo je i formiranje manjeg broja brahicita (Slika 20, c3).



Slika 20. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na morfogenezu kod ispitivanih vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I zabeležen na mikroskopu. A) *P. patens*: a1 – kontrolna grupa biljaka, a2 – 50 mM NaCl, a3 – 250 mM NaCl; B) *E. hungaricus*: b1 – kontrolna grupa biljaka, b2 - 50 mM NaCl, b3 – 250 mM NaCl; C) *H. heimii*: c1 – kontrolna grupa biljaka, c2 - 50 mM NaCl, c3 – 250 mM NaCl.

Kao što je i očekivano, biljke gajene u kontrolnoj grupi, na hranljivoj podlozi bez dodatka ABA i NaCl (nulta kontrola) nisu formirale brahicite, niti tmema ćelije u eksperimentu II kod sve tri ispitivane vrste (Slika 21, a1, b1, c1). Halofite *E. hungaricus* i *H. heimii* formiraju brahicite u najvećoj meri na vrhovima protonemalnih filamenata kada se tretiraju 50  $\mu$ M ABA tokom 72 sata (Slika 21, b2, c2), a što je evidentirano nakon 3 nedelje eksperimenta. Zanimljivo je da *P. patens* u svim tretmanima razvija normalnu hloronemu i kaulonemu, bez naznake fomiranja brahicita ili tmema ćelija (Slika 21, a). Halofite razvijaju brahicite u velikoj meri ukoliko se gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 i

250 mM NaCl sa dodatkom 50  $\mu$ M ABA. Ukoliko se međusobno uporede brio-halofitne vrste, zapaža se da *E. hungaricus* formira veliki broj brahicita gusto raspoređenih na protonemi (Slika 21, b3, b4), dok *H. heimii* naizgled formira nešto manji broj brahicita (Slika 21, c3, c4). Međutim, kod *H. heimii* se zapaža veći broj tmema ćelija nego kod vrsta iz familije Funariaceae (Slika 21, c3). Ovakve promene na morfo-anatomskom novou ukazuju na razliku u strategijama preživljavanja koje ove vrste koriste prilikom stresa izazvanog solima.

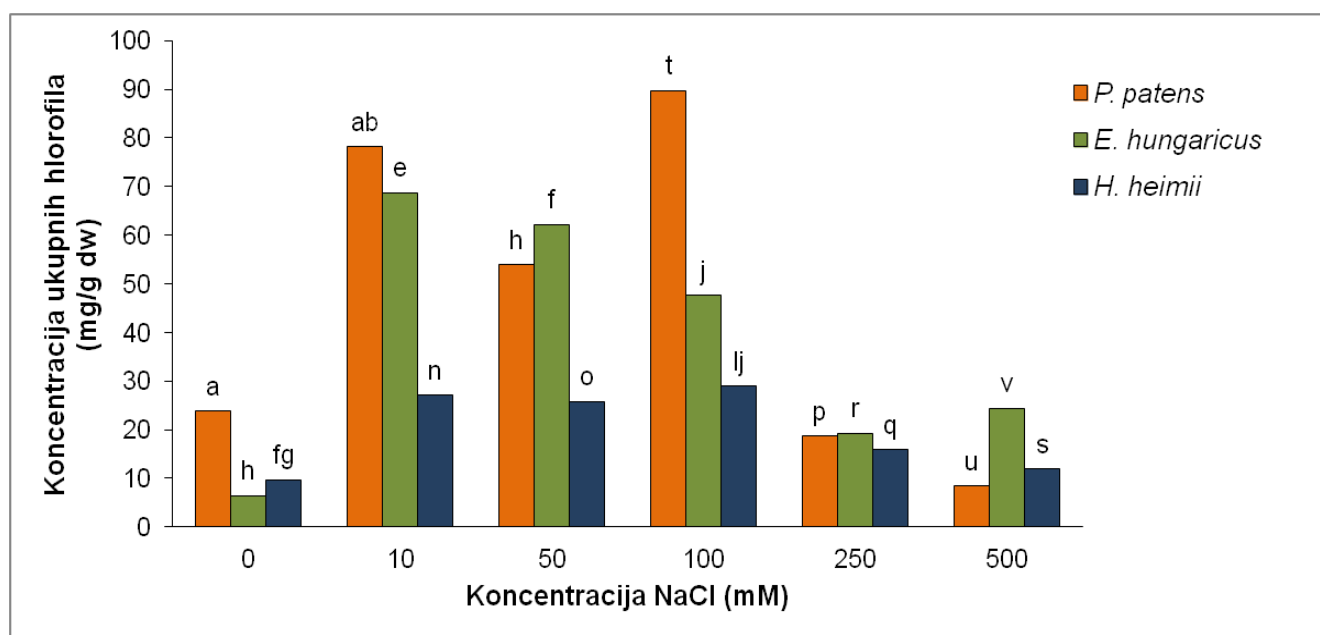


Slika 21. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na morfogenezu kod ispitivanih vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II zabeležen na mikroskopu. a) *P. patens*: a1 – kontrolna grupa biljaka (K0), a2 – biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50  $\mu$ M ABA (ABA 0); a3 – 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl, a4 – 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl; b) *E. hungaricus*: b1 – kontrolna grupa biljaka (K0), b2 – biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50  $\mu$ M ABA (ABA 0); b3 – 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl, b4 – 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl; c) *H. heimii*: c1 – kontrolna grupa biljaka (K0), c2 – biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50  $\mu$ M ABA (ABA 0); c3 – 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl, c4 – 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl.

#### 4.2. Spektrofotometrijska analiza fotosintetičkih pigmenata

Određivanje koncentracije fotosintetičkih pigmenata i njihovog međusobnog odnosa može biti jedan od značajnih pokazatelja stresa kod biljaka. Na grafiku 5 prikazana je vrednost ukupnih hlorofila kod sve tri ispitivane vrste nakon završetka eksperimenta I. Nehalofitna mahovina *P. patens* ima najveću koncentraciju ukupnih hlorofila u svim tretmanima u poređenju sa brio-halofitama, koje su

manje bogate hlorofilima. Generalno, trend promene ukupnih hlorofila u odnosu na povećanje koncentracije NaCl je sličan za sve tri ispitivane vrste. Naime, najmanja koncentracija ukupnih hlorofila se beleži u kontrolnoj grupi biljaka, dok se kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 10 i 50 mM NaCl uočava povećanje koncentracije ukupnih hlorofila. Visoke koncentracije NaCl (100, 250 i 500 mM) uslovljavaju smanjenje koncentracije ukupnih hlorofila kod sve tri vrste. Međutim, kod *P. patens* gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 100 mM NaCl uočava se znatno povećanje koncentracije ukupnih hlorofila, što može ukazivati da je ova vrsta izuzetno dobro prilagođena na intenzivniji stres izazvan solima u pogledu održavanja aktivnosti fotosintetičkog aparata. Sa druge strane, *E. hungaricus* i *H. heimii* odlikuje stabilniji trend opadanja ukupnih hlorofila usled povećanjem koncentracije NaCl. Među brio-halofitama, *E. hungaricus* ima veće koncentracije ukupnih hlorofila na svim tretmanima u poređenju sa *H. heimii*. Uopšteno, na niskim koncentracijama NaCl u hranljivoj podlozi povećana je koncentracija ukupnih hlorofila, dok visoke koncentracije NaCl dovode do smanjenja sinteze hlorofila u istim kontrolisanim uslovima.

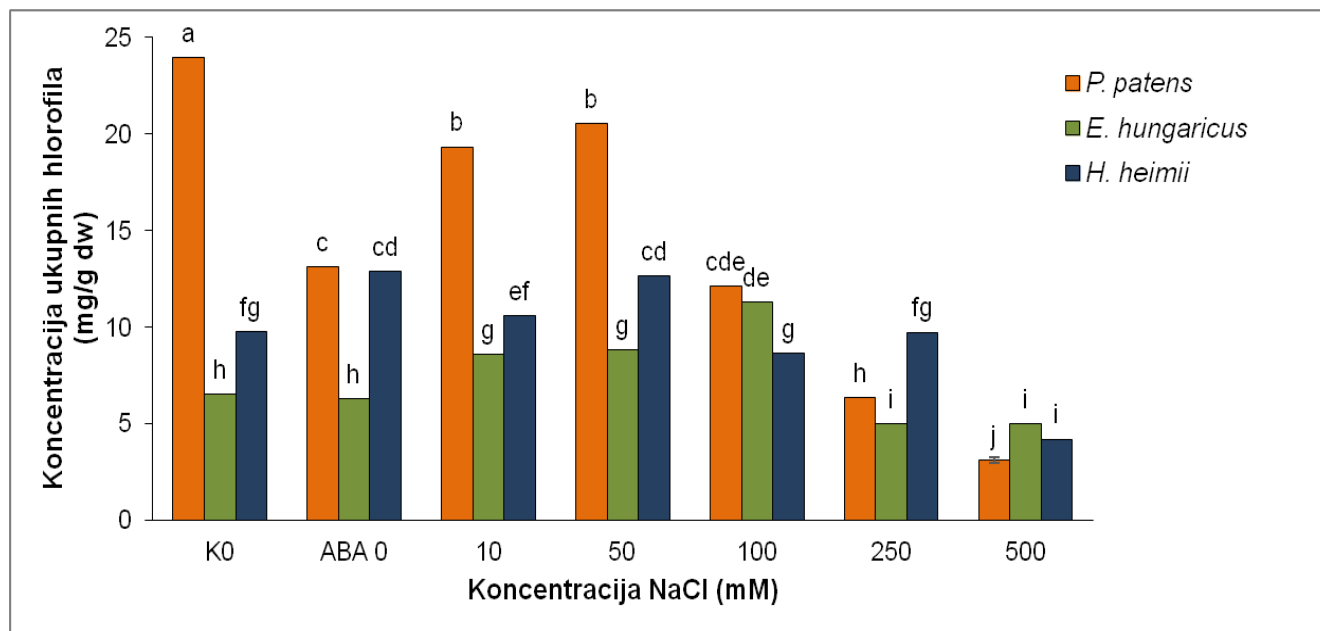


Grafik 5. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na ukupni sadržaj hlorofila kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I. (Slova prikazana na grafiku opisuju značajnost razlika između vrsta i između tretmana primenom Fisher-ovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ )).

Nakon završetka eksperimenta II, sve tri vrste mahovina pokazuju sličan trend kao i kada se gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom samo NaCl u eksperimentu I (grafik 6). Naime, *P. patens* ima najveću koncentraciju hlorofila od sve tri ispitivane vrste. Primena egzogene ABA različito utiče na sve tri ispitivane vrste. Kod *P. patens* ABA utiče na smanjenje koncentracije ukupnih hlorofila. Maksimalna vrednost koncentracije ukupnih hlorofila se beleži kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl i 50  $\mu$ M ABA. Generalno se uočava da su vrednosti koncentracije ukupnih hlorofila kod *P. patens* u eksperimentu II znatno manje nego kada se biljke izlože samo dejstvu NaCl u eksperimentu I. Visoke koncentracije NaCl u hranljivoj podlozi uslovljavaju smanjenje koncentracije ukupnih hlorofila kod sve tri ispitivane vrste. Vrstu *E. hungaricus* odlikuje stabilniji trend promene koncentracije ukupnih hlorofila. Primena egzogene ABA kod ove vrste ne dovodi do značajnih promena u koncentraciji ukupnih hlorofila. Kada se biljke nakon tretmana ABA gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl, blago se povećava koncentracija ukupnih hlorofila. Maksimalna vrednost koncentracije ukupnih hlorofila kod vrste *E. hungaricus* se beleži kod biljaka gajenih na

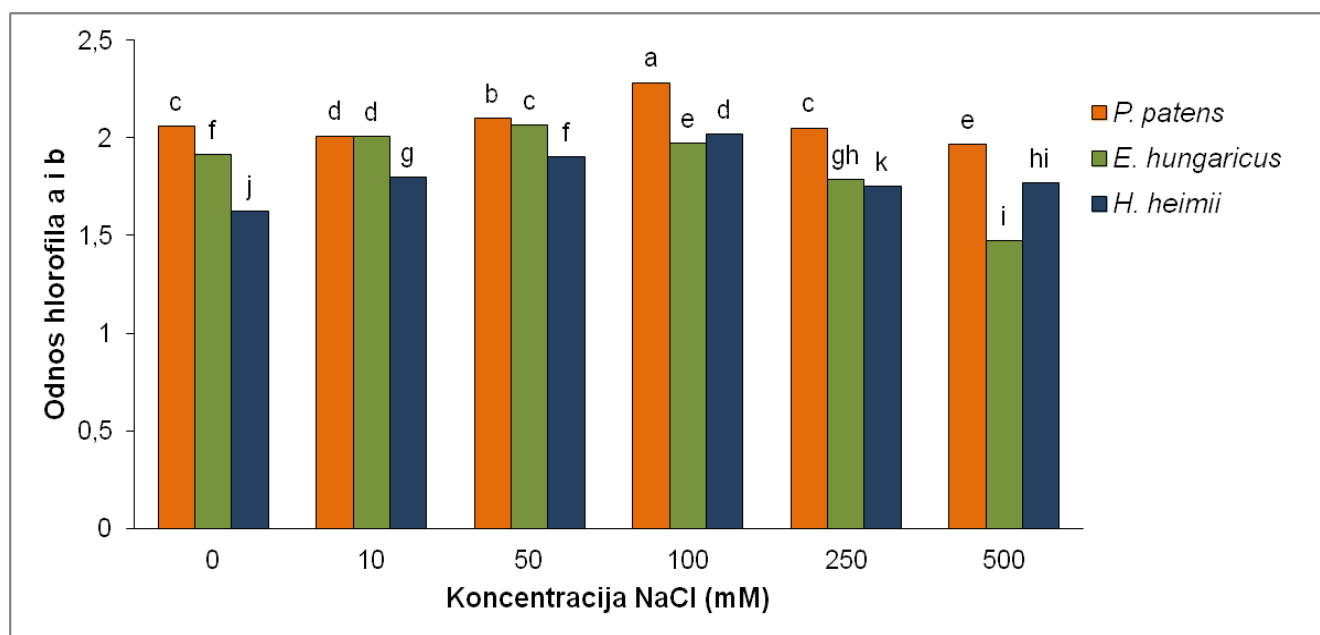


hranljivoj podlozi sa dodatkom 100 mM NaCl nakon predtretmana ABA. Sa daljim povećanjem koncentracije NaCl vrednost ukupnih hlorofila opada. Za razliku od vrsta iz familije Funariaceae, kod *H. heimii* primena egzogene ABA dovodi do blagog porasta koncentracije ukupnih hlorofila. Kao i kod *E. hungaricus*, promena koncentracije ukupnih hlorofila usled povećanja koncentracije NaCl u hranljivoj podlozi je stabilnija u odnosu na *P. patens*, mada se ne može uočiti specifičan trend. Generalno se može uočiti da je koncentracija ukupnih hlorofila niža u eksperimentu II (grafik 6) u odnosu na eksperiment I (grafik 5).



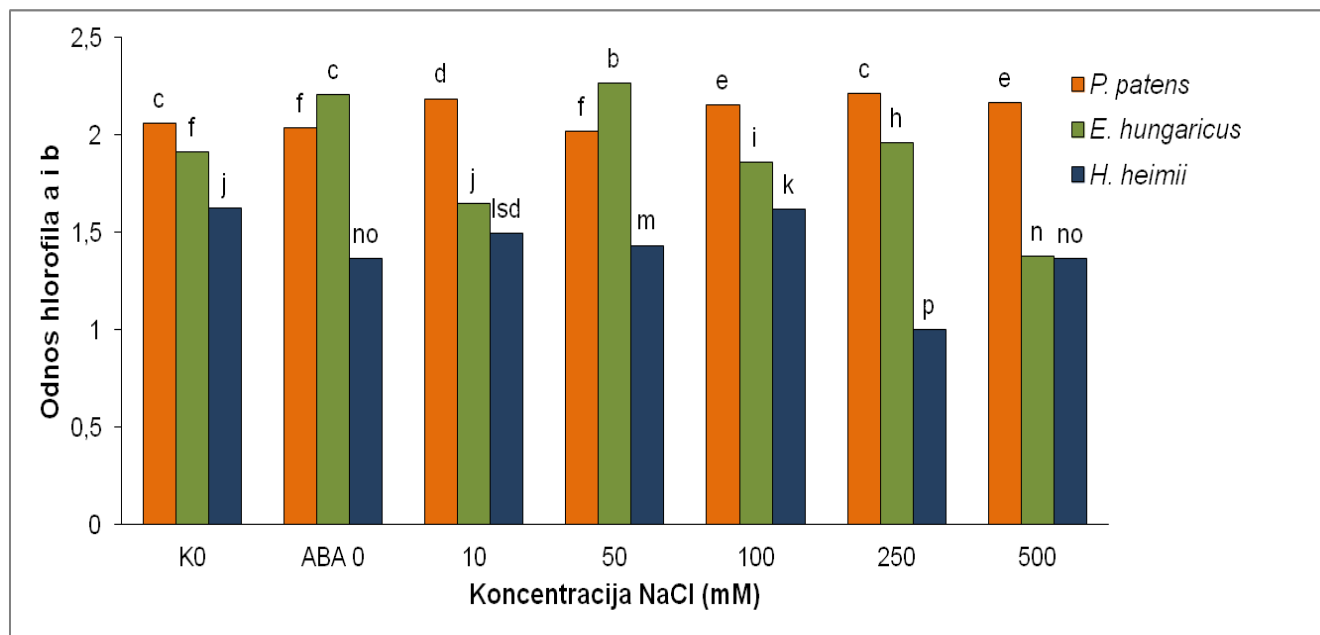
Grafik 6. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na ukupni sadržaj hlorofila kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II (KO - nulta kontrola; ABA 0– biljke tretirane samo ABA). (Slova prikazana na grafiku opisuju značajnost razlika između vrsta i između tretmana primenom Fisher-ovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ )).

Odnos hlorofila a i b može biti dobar pokazatelj intenziteta stresa. U optimalnim uslovima odnos hlorofila a i b kod vaskularnih biljaka je 3:1, dok je kod briofita nešto niži, oko 2:1. Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih na grafiku 7, uočava se da je odnos hlorofila a i b kod sve tri ispitivane vrste relativno stabilan na svim primenjenim koncentracijama NaCl. Odnos hlorofila a i b je najveći kod *P. patens*, što odgovara vrednostima dobijenih za koncentraciju ukupnih hlorofila. Najmanji odnos hlorofila a i b se uočava kod *H. heimii*. Za sve ispitivane vrste vrednost odnosa hlorofila a i b je u okviru 2:1, što implicira da biljke relativno dobro podnose stres izazvan solima.



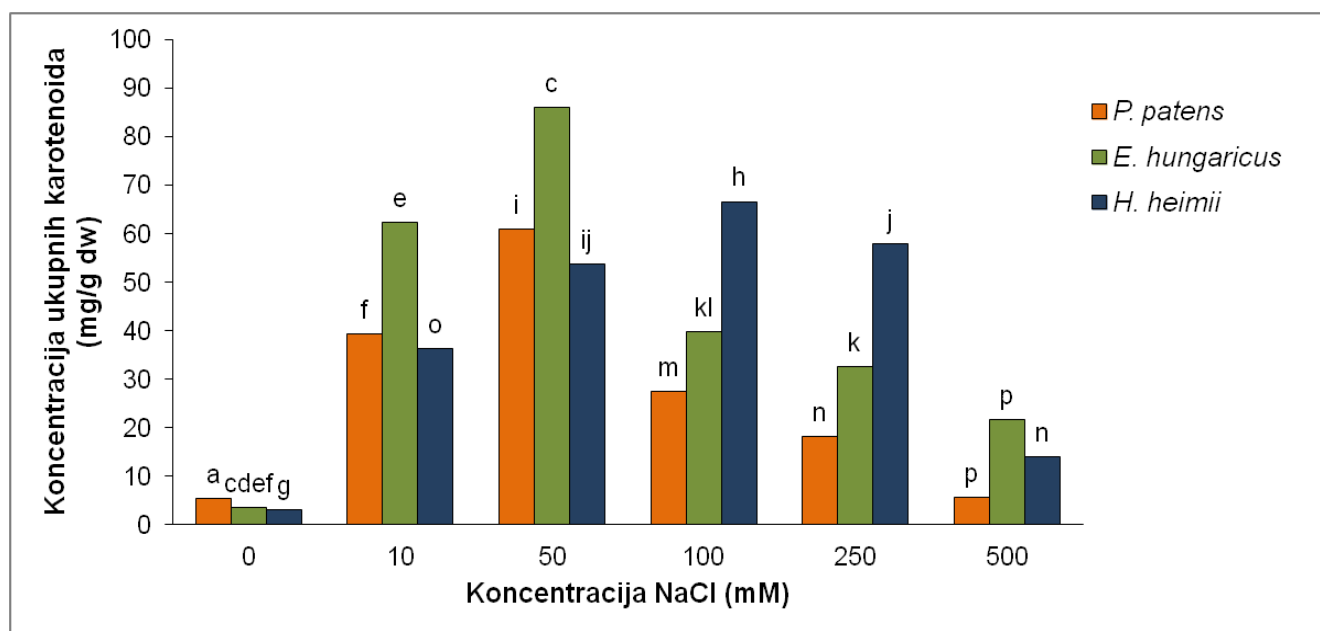
Grafik 7. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na odnos hlorofila a i b kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I. (Slova prikazana na grafiku opisuju značajnost razlika između vrsta i između tretmana primenom Fisher-ovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ )).

Odnos hlorofila a i b je nešto drugačiji kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i NaCl u eksperimentu II (grafik 8). Naime, odnos hlorofila a i b je visok za vrste *P. patens* i *E. hungaricus*, a vrednosti se kreću u okviru odnosa 2:1 za sve tretmane. Kod vrste *H. heimii* se beleži najmanja vrednost odnosa hlorofila a i b, ali je i kod nje relativno stabilna promena vrednosti u zavisnosti od primenjene koncentracije NaCl. Pokazano je da kod vrsta *E. hungaricus* i *P. patens* odnos hlorofila a i b ima veće vrednosti ukoliko se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA u odnosu na eksperiment I. Sa druge strane, vrednosti odnosa hlorofila a i b su neznatno manje za *H. heimii* u eksperimentu II u odnosu na eksperiment I. Moguće objašnjenje je da vrste različito reaguju na egzogenu ABA, odnosno signal koji ona nosi iz spoljašnje sredine, pa je u skladu sa time sinteza i degradacija hlorofila a i b, tj. njihov odnos različit kod različitih vrsta.



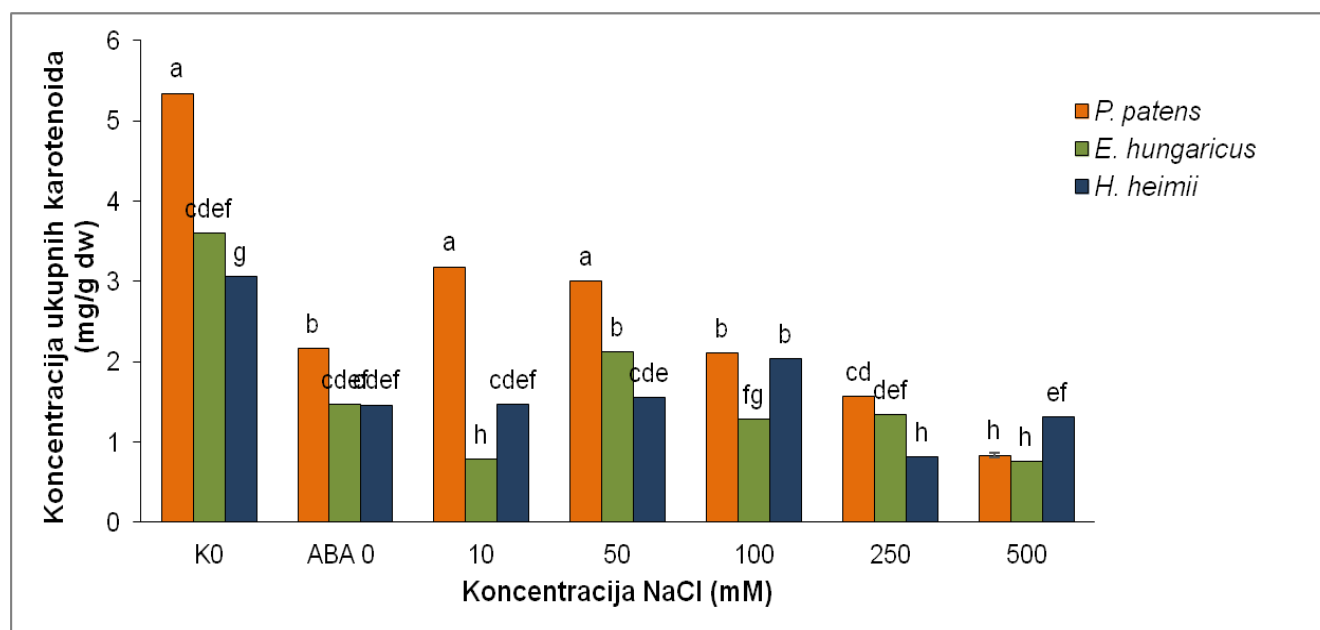
Grafik 8. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na na odnos hlorofila a i b kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II (K0 - nulta kontrola; ABA 0 – biljke tretirane samo ABA). (Slova prikazana na grafiku opisuju značajnost razlika između vrsta i između tretmana primenom Fisher-ovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ )).

Na grafiku 9 može se uočiti da koncentracija ukupnih karotenoida raste kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl. Sličan trend je već zabeležen i za hlorofile (grafik 5). Najniže koncentracije ukupnih karotenoida se uočavaju kod *P. patens* na svim primenjenim koncentracijama NaCl, dok je kod brio-halofita situacija drugačija. Naime, sa dodatkom nižih koncentracija NaCl u hranljivu podlogu dolazi do povećanja koncentracije ukupnih karotenoida višestruko u odnosu na kontrolnu grupu biljaka, što je posebno izraženo kod vrste *E. hungaricus*. Na hranljivoj podlozi sa dodatkom 10 i 50 mM NaCl najveća koncentracija ukupnih karotenoida je dokumentovana kod *E. hungaricus*, dok su najniže vrednosti dokumentovane kod *H. heimii*. Međutim, sa daljim povećanjem koncentracije NaCl u hranljivoj podlozi, zapaža se suprotan trend, odnosno, koncentracija karotenoida raste kod vrste *H. heimii*. Koncentracija ukupnih karotenoida je najviša kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 100 mM NaCl. Sa druge strane, koncentracija ukupnih karotenoida kod vrste *E. hungaricus* značajno opada na višim koncentracijama NaCl.



Grafik 9. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na ukupni sadržaj karotenoida kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I. (Slova prikazana na grafiku opisuju značajnost razlika između vrsta i između tretmana primenom Fisher-ovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ )).

Za razliku od eksperimenta I, gde je NaCl značajno uticao na povećanje koncentracije ukupnih karotenoida (grafik 9), primena egzogene ABA u eksperimentu II dovodi do značajnog smanjenja koncentracije ukupnih karotenoida (grafik 10). Generalno, na grafiku 10 se uočava da su maksimalne



Grafik 10. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na ukupni sadržaj karotenoida kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II (K0 - nulta kontrola; ABA 0 – biljke tretirane samo ABA). (Slova prikazana na grafiku opisuju značajnost razlika između vrsta i između tretmana primenom Fisher-ovog LSD testa ( $p \leq 0,05$ )).



vrednosti karotenoida zabeležene kod vrste *P. patens*, kao i da je trend opadanja koncentracije ukupnih karotenoida sličan trendu dobijenom u eksperimentu I. Niske koncentracije NaCl dovode do povećanja koncentracije ukupnih karotenoida, dok visoke koncentracije NaCl utiču na smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida kod *P. patens*.

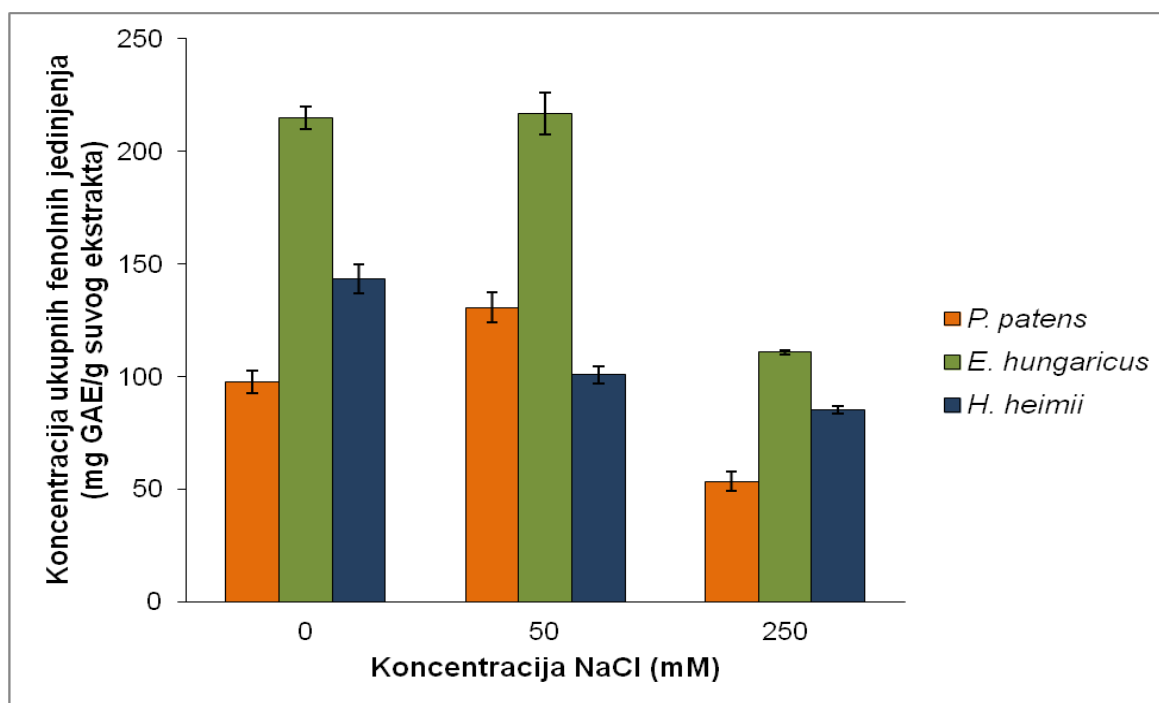
Sa druge strane, za vrstu *E. hungaricus* su dobijeni drugačiji rezultati u eksperimentu II u odnosu na eksperiment I. Naime, kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i NaCl koncentracija ukupnih karotenoida opada. Egzogena ABA dovodi do smanjenja koncentracije ukupnih karotenoida kod vrste *H. heimii*, mada je trend smanjenja koncentracije ukupnih karotenoida manje izražen nego kod vrste *E. hungaricus*. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i 100 mM NaCl beleži se maksimalna vrednost koncentracije ukupnih karotenoida kod *H. heimii*. Međutim, u eksperimentu II najveća koncentracija ukupnih karotenoida je zabeležena kod vrste *P. patens* na svim tretmanima osim na najvišoj koncentraciji NaCl od 500 mM, na kojoj su najveće koncentracije ukupnih karotenoida dokumentovane kod vrste *H. heimii*.

### **4.3. Analiza fenolnih jedinjenja i terpenoida**

#### **4.3.1. Određivanje količine ukupnih fenola Folin-Ciocalteu metodom**

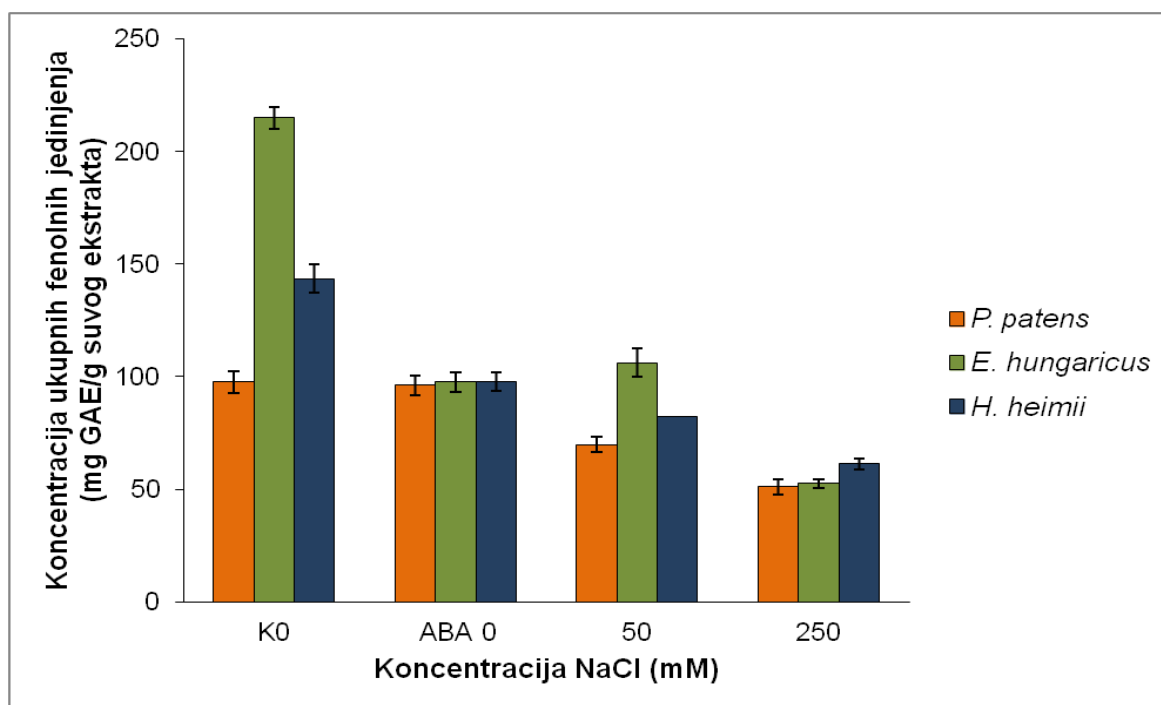
Fenolna jedinjenja su grupa raznovrsnih sekundarnih metabolita zastupljenih u velikoj meri kod briofita. Njihovo prisustvo, kao i promena u njihovom sadržaju su dobar pokazatelj sposobnosti biljaka da se izbore sa stresom, pa tako i onim izazvanim solima, pošto fenoli mogu biti jedna od bitnih neenzimskih komponenti zaštite od oksidativnog stresa.

Ukupna fenolna jedinjenja su određivana spektrofotometrijski, pri čemu je utvrđeno da se najveća količina prisutnih fenola nalazi u ekstraktu vrste *E. hungaricus*, dok se najmanje fenolnih jedinjenja nalazi kod *P. patens* u kontroli eksperimenta I (grafik 11). Dodatkom 50 mM NaCl u hranljivu podlogu uočava se neznatno povećanje ukupnih fenola kod *P. patens*, dok se za *E. hungaricus* ne uočavaju značajne promene u koncentraciji ukupnih fenola. Za razliku od njih, kod *H. heimii* opada koncentracija ukupnih fenola na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl. Ukoliko se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, koncentracija ukupnih fenola opada značajno kod vrsta *E. hungaricus* i *P. patens*, dok se kod halofite *H. heimii* ne uočava drastična razlika u koncentraciji fenolnih jedinjenja na umerenom stresu (50 mM NaCl) i intenzivnom stresu (250 mM NaCl).



Grafik 11. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I.

Ukoliko se primeni egzogena ABA u eksperimentu II, dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih fenola kod brio-halofitnih vrsta u odnosu na nultu kontrolu (grafik 12). Za razliku od njih, kod *P. patens* nema razlike u koncentraciji ukupnih fenola između biljaka nulte kontrole i biljaka tretiranih ABA (ABA 0). Sve tri ispitivane vrste imaju sličnu koncentraciju ukupnih fenola nakon tretmana sa ABA. Ukoliko se biljke nakon predtretmana gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, sve tri ispitivane vrste pokazuju različite trendove. U ekstraktima *P. patens* se detektuje manje fenolnih jedinjenja u poređenju sa kontrolama. Slično tome, vrsta *H. heimii* ima sličan obrazac smanjenja ukupnih fenolnih jedinjenja. Neznatan porast koncentracije ukupnih fenola se beleži kod *E. hungaricus*.



Grafik 12. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II.

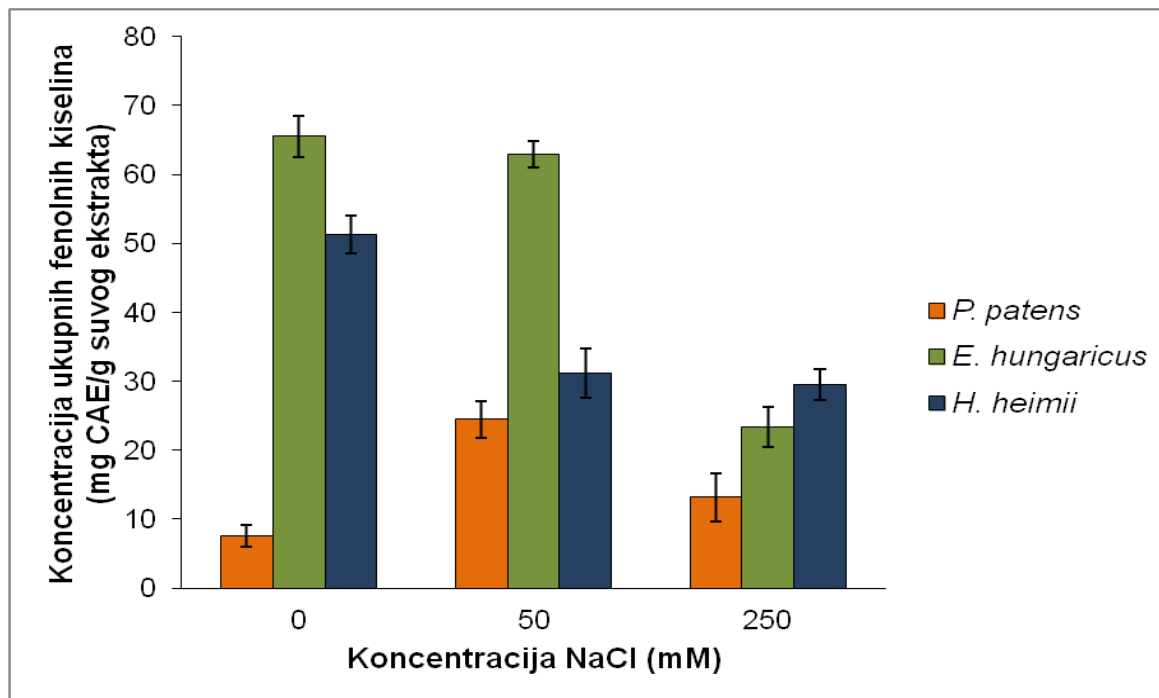
Kod biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA uočeno je dalje smanjenje koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja, što je i očekivano. Značajno je istaći da su koncentracije ukupnih fenola u eksperimentu II skoro dva puta manje od vrednosti dobijenih u eksperimentu I. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl je zabeležena relativno visoka koncentracija fenolnih jedinjenja kod sve tri vrste briofita.

#### 4.3.2. Određivanje ukupnih fenolnih kiselina

Fenolne kiseline su veoma zastupljena komponenta kod biljaka i čine veliki udeo ukupnih fenolnih jedinjenja koja se mogu indentifikovati kod određene vrste. Kolorimetrijskom analizom fenolnih kiselina biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl u eksperimentu I zapaženo je da trend promene koncentracije ukupnih fenolnih kiselina (grafik 13) odgovara trendu promene koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja (grafik 11). Međutim, bitne razlike u zastupljenosti fenolnih kiselina postoje među ispitivanim vrstama. Kod *P. patens* fenolne kiseline su zastupljene u maloj meri, kao deseti deo ukupnih detektovanih fenolnih jedinjenja. Kod *E. hungaricus* je taj udeo oko četvrtine, dok kod *H. heimii* fenolne kiseline čine bitnu komponentu ukupnih fenola (oko trećine ukupnih fenolnih jedinjenja).

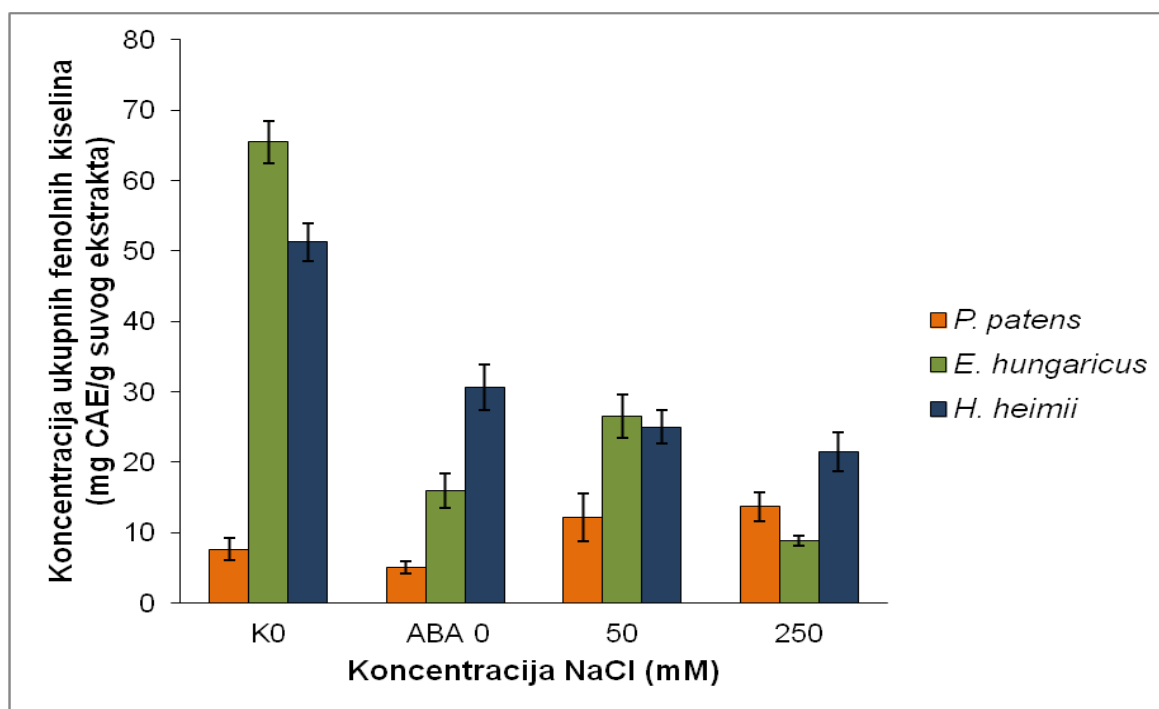
Generalno, najveća koncentracija fenolnih kiselina se detektuje kod vrste *E. hungaricus*, a najmanja kod vrste *P. patens*, što je u skladu sa rezultatima dobijenim Folin-Ciocalteu testom (grafik 11). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, dolazi do neznatnog povećanja koncentracije fenolnih kiselina u ekstraktu vrste *P. patens*. Za razliku od nje, u ekstraktu vrste *H. heimii* se beleži značajano smanjenje koncentracije ukupnih fenolnih kiselina. Kod vrste *E. hungaricus* nema značajnije promene u koncentraciji fenolnih kiselina kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl. Koncentracija od 250 mM NaCl utiče na smanjenje koncentracije ukupnih fenolnih kiselina kod vrsta *P. patens* i *E. hungaricus*, s tim da je značajnije smanjenje

primetno za vrstu *E. hungaricus*. Za razliku od njih, *H. heimii* održava stabilan nivo ukupnih fenolnih kiselina kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM i 250 mM NaCl.



Grafik 13. Uticaj NaCl na ukupni sadržaj fenolnih kiselina kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I.

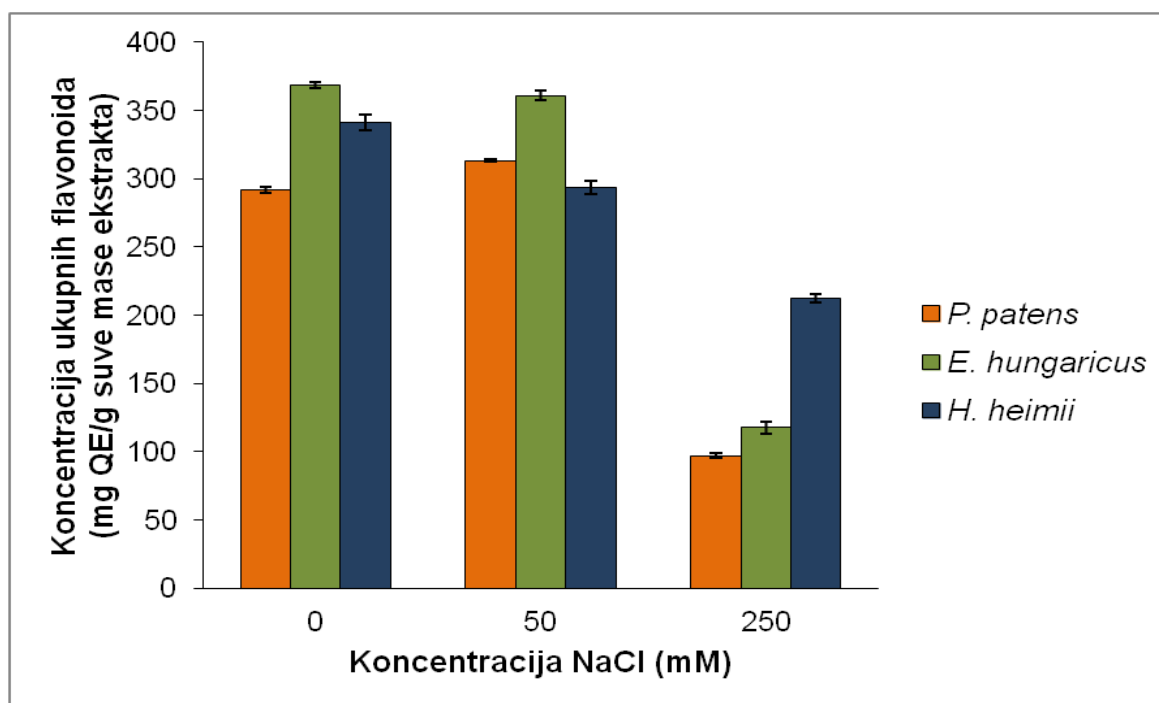
Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 14) u eksperimentu II, uočava se da je trend promene koncentracije ukupnih fenolnih kiselina za sve tri ispitivane vrste sličan promenama u koncentraciji ukupnih fenolnih jedinjenja (grafik 12). Naime, najmanja količina fenolnih kiselina je detektovana kod vrste *P. patens*, a najviša kod *E. hungaricus*. Egzogeni ABA utiče na smanjenje koncentracije ukupnih fenolnih kiselina kod halofitnih vrsta, za razliku od vrste *P. patens*. Ukoliko se biljke nakon predtretmana ABA gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, može se uočiti porast koncentracije ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima *P. patens* i *E. hungaricus*, dok se za vrstu *H. heimii* uočava neznatno smanjenje pri istom tretmanu. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl zapaža se značajno smanjenje koncentracije ukupnih fenolnih kiselina kod *E. hungaricus*, što je u korelaciji sa rezultatima prikazanim na grafiku 12. Sa druge strane, kod vrste *P. patens* i *H. heimii* koncentracije ukupnih fenolnih kiselina su slične kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM kao i sa dodatkom 250 mM NaCl. Uopšteno, dobijeni rezultati za koncentraciju ukupnih fenolnih kiselina su u korelaciji sa rezultatima dobijenim za koncentraciju ukupnih fenola kod sve tri ispitivane vrste, što ukazuje da su fenolne kiseline značajna komponenta kod ispitivanih mahovina i da aktivno doprinose odgovoru na egzogeni NaCl i ABA.



Grafik 14. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na ukupni sadržaj fenolnih kiselina kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II.

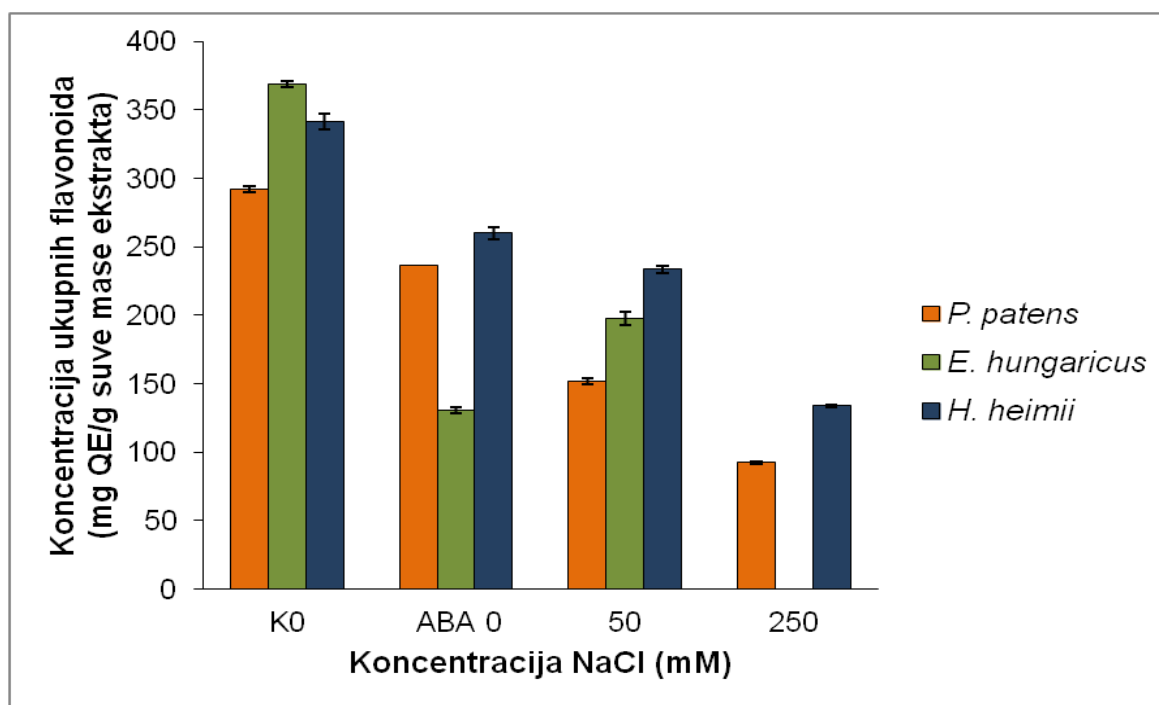
#### 4.3.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Flavonoidi su velika klasa solubilnih fenolnih jedinjenja široko rasprostranjenih među biljkama. Kolorimetrijskom metodom je određivana koncentracija ukupnih flavonoida u ekstraktu, pri čemu je uočeno da su flavonoidi jedna od najzastupljenih komponenti ukupnih fenola kod ispitivanih vrsta mahovina. U kontrolnoj grupi biljaka zabeležena je najveća koncentracija ukupnih flavonoida za vrstu *E. hungaricus* (grafik 15). Međutim, i druge dve ispitivane vrste poseduju visoke koncentracije flavonoida. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl ne dolazi do značajne promene koncentracije ukupnih flavonoida, pa se može pretpostaviti da umeren stres izazvan NaCl ne utiče značajno na količinu ove fenolne komponente. Povećanjem koncentracije NaCl (250 mM) u hranljivoj podlozi, zapaženo je značajno smanjenje koncentracije ukupnih flavonoida kod sve tri ispitivane vrste. Značajno smanjenje koncentracije ukupnih flavonoida je uočljivo kod vrsta *E. hungaricus* i *P. patens*. Na osnovu dobijenih rezultata (grafik 15) može se pretpostaviti da se prilikom intenzivnijeg stresa izazvanog NaCl flavonoidi koriste u odbrani biljaka. Tokom umerenog stresa, flavonoidi najverovatnije nisu glavna komponenta koja doprinosi toleranciji na stres.



Grafik 15. Uticaj NaCl na ukupni sadržaj flavonoida kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I.

Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA, evidentno je smanjenje koncentracije ukupnih flavonoida u ekstraktima kod sve tri ispitivane vrste (grafik 16). Međutim, najznačajnije smanjenje odlikuje vrstu *E. hungaricus*. Kada se biljke nakon predtretmana ABA gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, uočavaju se različite promene za sve tri vrste. Naime, koncentracija ukupnih flavonoida se značajno smanjuje kod *P. patens* u poređenju sa *H. heimii* kod koje je smanjenje neznatno. Za razliku od njih, u ekstraktu vrste *E. hungaricus* se beleži porast koncentracije ukupnih flavonoida. Značajan je rezultat da ukupni flavonoidi kod *E. hungaricus* nisu detektovani nakon dodatka 250 mM NaCl u hranljivu podlogu.



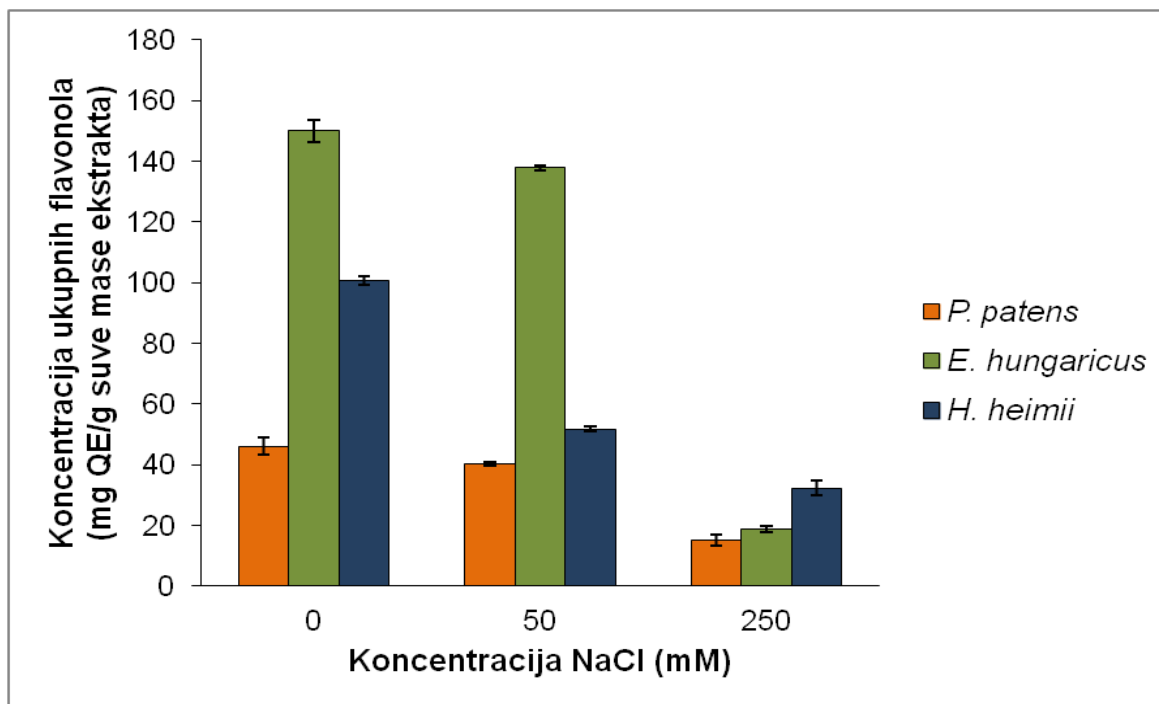
Grafik 16. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na ukupni sadržaj flavonoida kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II.

Sa druge strane, kod vrsta *P. patens* i *H. heimii* postoji linearna zavisnost smanjenja koncentracije ukupnih flavonoida u zavisnosti od primenjene koncentracije soli i ABA u hranljivoj podlozi. Generalno se može uočiti da su flavonoidi značajna komponenta fenolnih jedinjenja koja se u velikoj količini nalazi kod sve tri ispitivane vrste, ali i to da učestvuju u odgovoru na stres izazvan visokim koncentracijama NaCl.

#### 4.3.4. Određivanje ukupnih flavonola

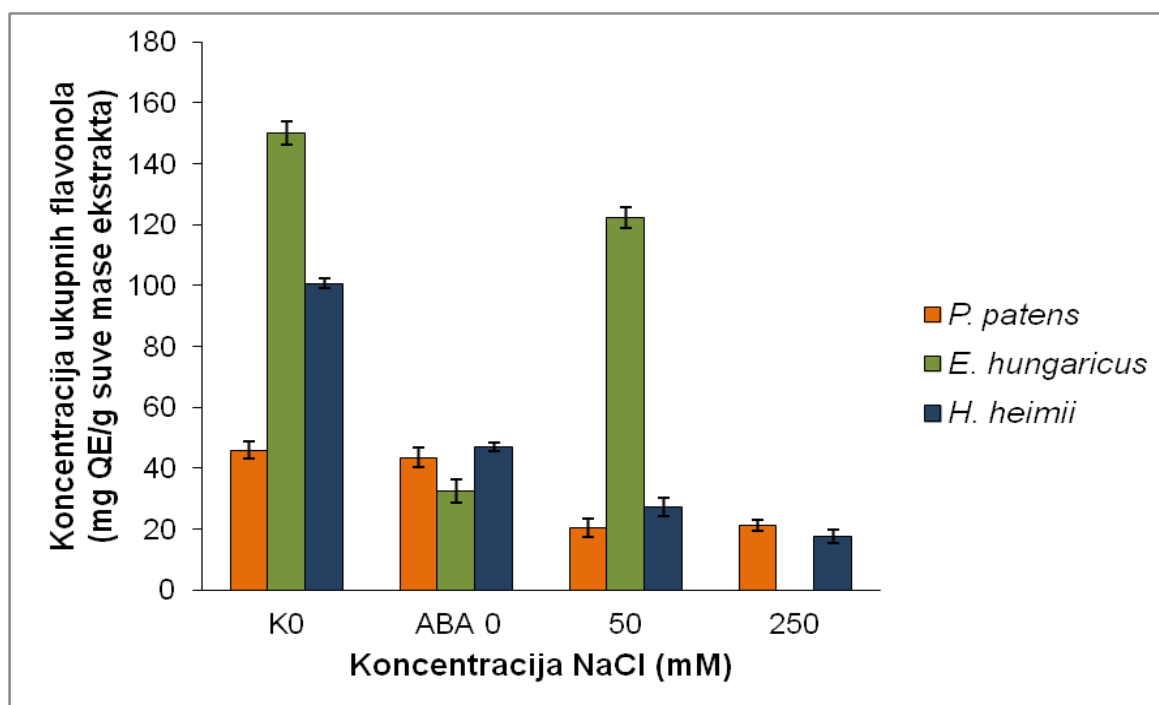
Flavonoli su najraznovrsnija podgrupa antoksanina i obuhvataju veliki broj jedinjenja zastupljenih kod biljaka. Kolorimetrijskom metodom je određivana koncentracija ukupnih flavonola u ekstraktima odabranih vrsta mahovina u cilju praćenja uticaja efekta egzogenog NaCl i ABA na sadržaj flavonola. Kod biljaka u kontrolnoj grupi u eksperimentu I uočljivo je prisustvo značajne količine flavonola (grafik 17). Kod vrste *P. patens* jednu četvrtinu ukupnih flavonoida čine flavonoli, dok je kod vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* zastupljenost flavnola oko trećine. Promena koncentracije ukupnih flavonola kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl je ista kao i promena ukupnih flavonoida (grafik 15). Najveće smanjenje koncentracije ukupnih flavonola se uočava kod vrste *E. hungaricus*, dok vrste *H. heimii* i *P. patens* pokazuju gotovo linearnu zavisnost smanjenja ukupnih flavonola sa povećanjem koncentracije NaCl u podlozi.





Grafik 17. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na ukupni sadržaj flavonola kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I.

Rezultati dobijeni merenjem koncentracije ukupnih flavonola u eksperimentu II prikazani su na grafiku 18. Zapaža se da promena koncentracija ukupnih flavonola odgovara promenama koncentracija ukupnih flavonoida (grafik 16). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA uočava se smanjenje koncentracije ukupnih flavonola kod vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*, dok se kod vrste *P. patens* ne uočava značajna razlika u koncentraciji flavonola. Ako se u hranljivu podlogu pored dodatka ABA doda i NaCl, uočava se smanjenje vrednosti ukupnih flavonola u ekstraktima vrsta *P. patens* i *H. heimii*. Za razliku od njih, kod *E. hungaricus* koncentracija ukupnih flavonola naglo raste. Kod biljaka vrste *E. hungaricus* gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl flavonoli nisu detektovani, što je u skladu sa rezultatima prikazanim na grafiku 16. Sa druge strane, visoke koncentracije NaCl nemaju uticaj na značajne promene u koncentraciji flavonola u ekstraktima *P. patens* i *H. heimii*.

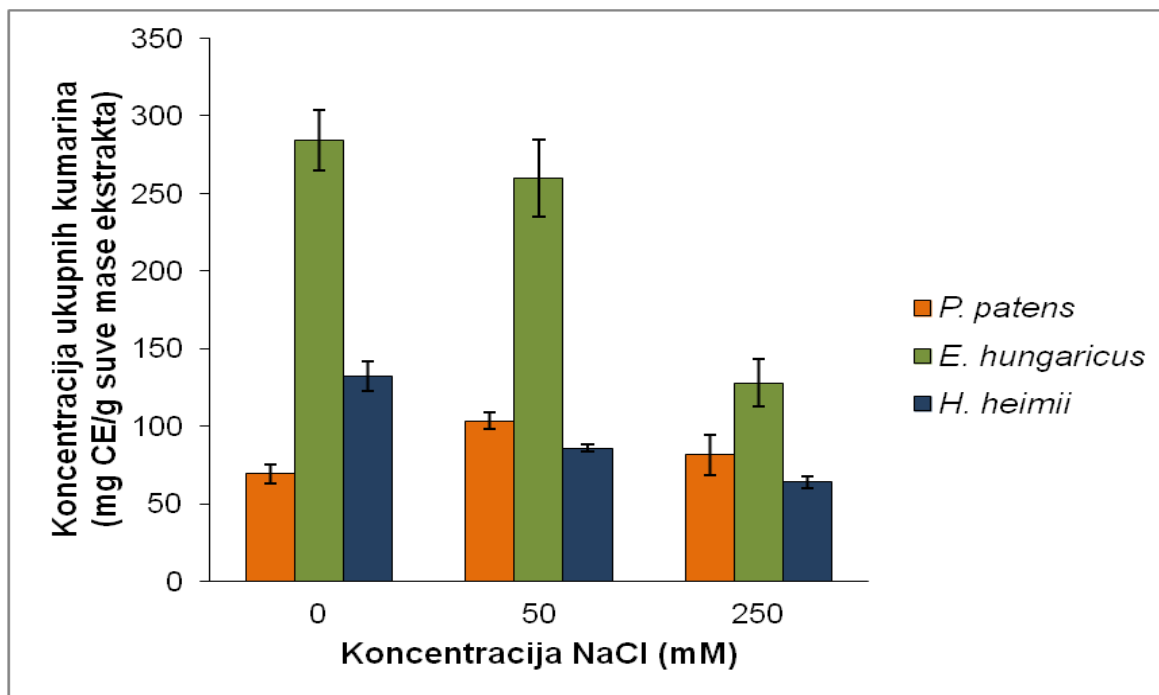


Grafik 18. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na ukupni sadržaj flavonola kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II.

Na osnovu dobijenih rezultata možemo pretpostaviti da su flavonoli jedna od najzastupljenijih grupa među flavonoidima i da igraju bitnu ulogu kod ispitivanih vrsta mahovina. Dinamična promena u koncentraciji flavonola kod vrste *E. hungaricus* je verovatno u vezi sa aktivnim učešćem ovih jedinjenja u toleranciji na stres.

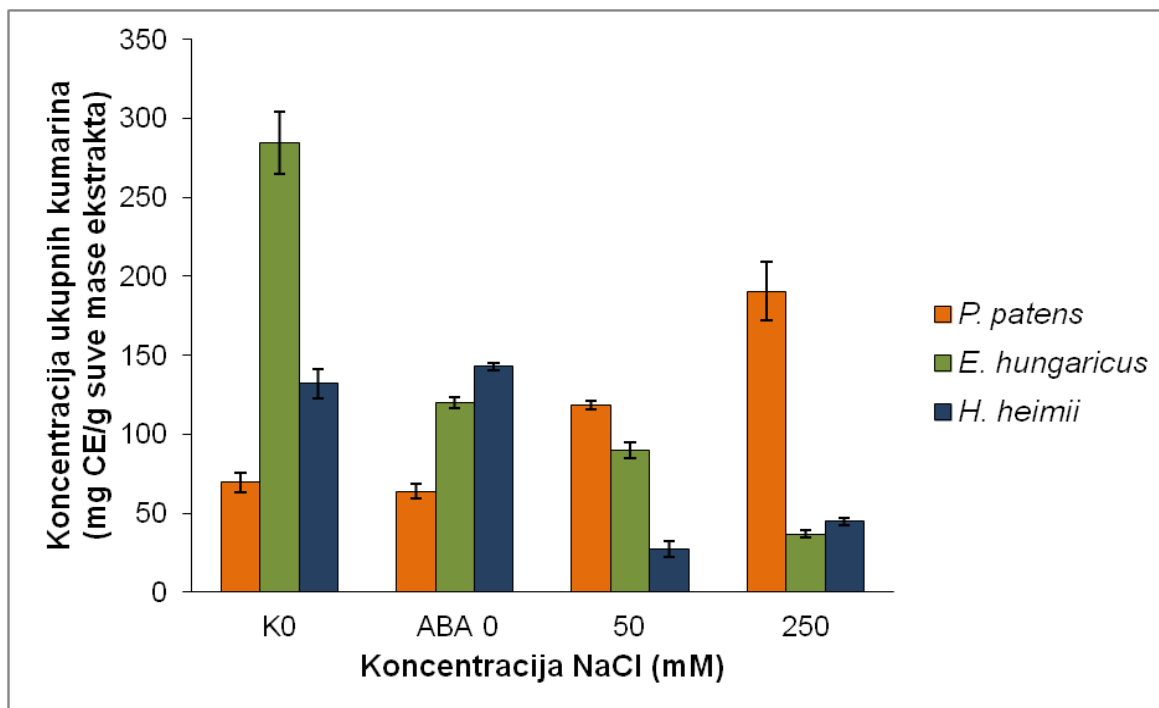
#### 4.3.5. Određivanje ukupnih kumarina

Kumarini su veoma zastupljena grupa fenolnih jedinjenja među biljkama i promena njihove koncentracije u ekstraktima može ukazivati na njihovu ulogu u odgovoru na stres kod ispitivanih vrsta briofita. Na osnovu rezultata eksperimenta I (grafik 19) može se zaključiti da su kumarini zastupljena komponenta fenolnih jedinjenja kod sve tri ispitivane vrste briofita. Međutim, u najvećoj meri kumarini se detektuju kod vrste *E. hungaricus*, dok je njihova koncentracija nešto manja kod *H. heimii* i *P. patens*. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl, uočava se postepeno smanjenje koncentracije ukupnih kumarina kod vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*. Nasuprot njima, kod vrste *P. patens* se koncentracija ukupnih kumarina ne menja značajno dodatkom različitih koncentracija NaCl u hranljivu podlogu. Visoke koncentracije NaCl (250 mM) utiču na smanjenje ukupnih kumarina. Međutim, u ekstraktima biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl uočava se da su kumarini prisutni u visokoj koncentraciji. Od sve tri ispitivane vrste, kumarini su najmanje zastupljeni kod *H. heimii*, dok ih najviše ima kod *E. hungaricus*.



Grafik 19. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na ukupni sadržaj kumarina kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I.

Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA u eksperimentu II, uočava se značajno smanjenje koncentracije ukupnih kumarina kod vrste *E. hungaricus* (grafik 20). Egzogeni ABA ne utiče na promenu koncentracije kumarina kod vrsta *P. patens* i *H. heimii*. Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i NaCl, uočavaju se razlike u koncentraciji ukupnih kumarina koje su specifične za svaku ispitivanu vrstu. U ekstraktima vrsta *E. hungaricus* i *P. patens* beleži se veća koncentracija ukupnih kumarina nego u kontrolnim grupama (K0 i ABA0), dok je evidentno značajno smanjenje koncentracije ukupnih kumarina kod vrste *H. heimii*. Međutim, ukoliko se ove biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, koncentracija ukupnih kumarina raste kod vrste *P. patens*, dok značajno opada kod *E. hungaricus*.



Grafik 20. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na ukupni sadržaj kumarina kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II.

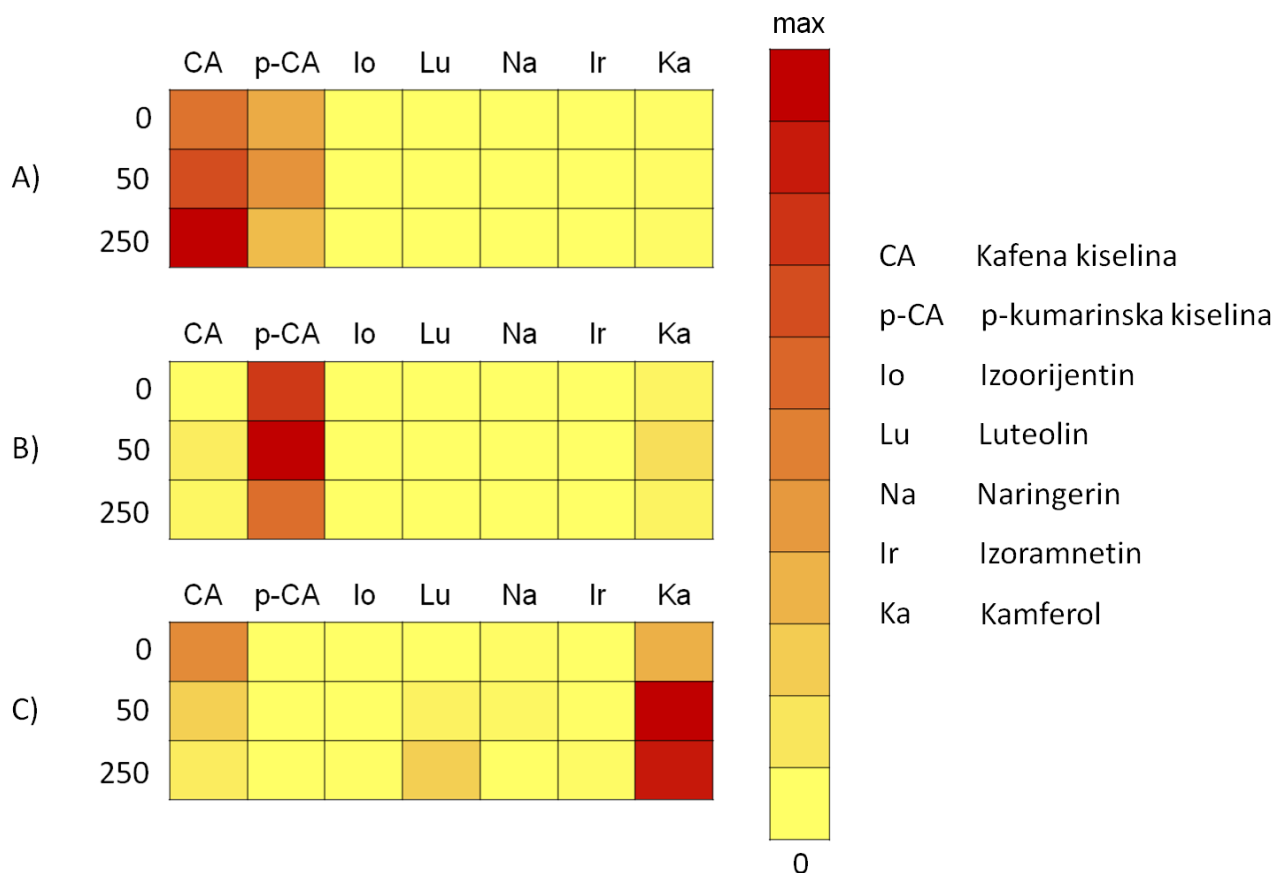
Ovakva promena koncentracije kumarina kod vrste *P. patens* je zanimljiv rezultat, s obzirom na to da je nehalofitna vrsta, pa se može pretpostaviti da kumarini delimično doprinose zaštiti i preživljavanju ove vrste. Sa druge strane, kod brio-halofita (*E. hungaricus* i *H. heimii*) se uočava smanjenje koncentracije kumarina, pa se može zaključiti da oni aktivno učestvuju u odgovoru na stres.

#### 4.3.6. Određivanje fenolnih jedinjenja UHPLC/ DAD/ (±) HESI - MS2 analizom

Kvantifikacija fenolnih jedinjenja kod ispitivanih vrsta je u skladu sa rezultatima dobijenim kolorimetrijskim metodama. Korišćenjem komercijalnih standarda za različita fenolna jedinjenja (kafena kiselina (CA), p-kumarinska kiselina (p-CA), vanilin (Va), rutin (Ru), izokvercitrin (Iq), izoorijentin (Io), kvercitrin (Qe), luteolin (Lu), naringenin (Na), apigenin (Ap), izoramnetin (Ir), kamferol (Ka)), određivani su kvalitativni i kvantitativni sastav fenolnih jedinjenja u ekstraktima.

Relativna zastupljenost ukupnih fenolnih jedinjenja je prikazana na šemi 1 za sve tri ispitivane vrste u eksperimentu I. Jedinjenja koja su detektovana u ekstraktima svih ispitivanih vrsta su: CA, p-CA, Io, Lu, Na, Ir i Ka. Na osnovu rezultata prikazanih na šemi 1 može se zaključiti da je najzastupljenija fenolna kiselina kod vrste *P. patens* CA i da se njena koncentracija povećava u ekstraktu biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom NaCl (Grafik 21 A). Maksimalne vrednosti CA su detektovane kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl. Pored CA, u većoj meri je prisutna i p-CA, čija je zastupljenost relativno ujednačena u kontroli i tretmanima sa NaCl kod ove vrste. Ostala fenolna jedinjenja koja su detektovana u ekstraktu *P. patens* su relativno male zastupljenosti i ne pokazuju značajne promene usled gajenja biljaka na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl. Za razliku od *P. patens*, kod brio-halofitne vrste *E. hungaricus* najzastupljenija je p-CA. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, koncentracija p-CA dostiže maksimalnu vrednost (Grafik 21 B). Sa druge strane, zastupljenost p-CA opada kod biljaka gajenih na

hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl. Pored p-CA, u manjoj meri je zastupljen Ka u ispitivanim ekstraktima. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, Ka dostiže maksimalnu vrednost. Kod vrste *H. heimii* u ekstraktima kontrolne grupe biljaka su najzastupljeniji CA i Ka (Grafik 21 C). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, dolazi do značajnih promena u količini fenolnih jedinjenja. Naime, opada relativna zastupljenost CA, dok značajno raste koncentracija Ka koja dostiže maksimalne vrednosti. Međutim, kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, količina CA u ekstraktu opada, dok se zastupljenost Ka neznatno smanjuje. Zanimljiv rezultat je da se kod biljaka *H. heimii* gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl beleži značajan porast Lu, što nije bilo evidentno kod vrsta iz familije Funariaceae.



Grafik 21. Relativna zastupljenost fenolnih jedinjenja kod vrsta *P. patens* (A), *E. hungaricus* (B) i *H. heimii* (C) u eksperimentu I. Predstavljena su jedinjenja koja su detektovana kod sve tri ispitivane vrste. Na osnovu intenziteta obojenosti prikazanoj na skali (0-max) tumači se zastupljenost određenog jedinjenja u tretmanu.

Koncentracija svih fenolnih jedinjenja detektovanih kod *P. patens* u eksperimentu I je prikazana u tabeli 4 i detaljnije opisuje rezultate na grafiku 21 (A). Kod kontrolne grupe biljaka se, pored dominantne CA, detektuju u većoj količini p-CA i Lu, ali i Ka, Na i Ir. Od korišćenih standarda, kod kontrolnih biljaka nisu detektovani Va, Ru, Iq, Qe i Ap. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, zapaža se da koncentracije CA, p-CA, Lu, Na i Ka neznatno rastu, dok su ostala fenolna jedinjenja bila ispod granice detekcije. Usled dodavanja 250 mM NaCl u hranljivu podlogu, koncentracija CA značajno raste kod *P. patens*, dok koncentracija p-CA, Lu i Na opada. Bitno

je istaći da se kod ovih biljaka može detektovati Io, koji nije bio prisutan kod biljaka u kontrolnoj grupi i usled dodavanja 50 mM NaCl u hranljivu podlogu.

Tabela 4. Uticaj egzogenog NaCl na količinu fenolnih jedinjenja kod vrste *P. patens*, izražena u jedinicama ng/100 mg

<i>P. patens</i>	0	50 mM	250 mM
Kafena kiselina	13,1925	16,7260	23,8750
p-Kumarinska kiselina	7,9330	10,1469	6,3462
Vanilin	0,0000	0,0000	0,0000
Rutin	0,0000	0,0000	0,0000
Izokvercitrin	0,0000	0,0000	0,0000
Izoorijentin	0,0000	0,0000	0,0540
Kvercitrin	0,0000	0,0000	0,0000
Luteolin	0,0061	0,0090	0,0030
Naringenin	0,0108	0,0260	0,0000
Apigenin	0,0000	0,0000	0,0000
Izoramnetin	0,0054	0,0000	0,0000
Kamferol	0,2071	0,2860	0,4300

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 5 moguće je uočiti da je najzastupljenija p-CA kod vrste *E. hungaricus*, kako kod kontrolne grupe biljaka, tako i kod biljaka gajenih na podlozi da dodatkom NaCl, što je u skladu sa rezultatima prikazanih na grafiku 21 (B). Pored p-CA, evidentno je prisustvo Ka, CA i Lu, čija koncentracija raste kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl. Nasuprot tome, koncentracija svih navedenih fenolnih jedinjenja opada kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl. Zanimljiv rezultat se uočava kod ovih biljaka, a to je da se detektuje Ir, koji nije bio prisutan kod biljaka u ostalim tretmanima. Fenolna jedinjenja koja su bila ispod granice detekcije kod *E. hungaricus* su Va, Ru, Iq, Qe, Io, Na i Ap. Može se uočiti da je kod ove vrste manja raznovrsnost prisutnih fenolnih jedinjenja nego kod *P. patens*.

Tabela 5. Uticaj egzogenog NaCl na količinu fenolnih jedinjenja kod vrste *E. hungaricus*, izražena u jedinicama ng/100 mg

<i>E. hungaricus</i>	0	50 mM	250 mM
Kafena kiselina	0,2001	1,2710	0,5930
p- Kumarinska kiselina	13,3354	17,0964	9,7565
Vanilin	0,0000	0,0000	0,0000
Rutin	0,0000	0,0000	0,0000
Izokvercitrin	0,0000	0,0000	0,0000
Izoorijentin	0,0000	0,0000	0,0000
Kvercitrin	0,0000	0,0000	0,0000
Luteolin	0,0100	0,0580	0,0650
Naringenin	0,0000	0,0000	0,0000
Apigenin	0,0000	0,0000	0,0000
Izoramnetin	0,0000	0,0000	0,0310
Kamferol	0,7595	2,2530	0,8460

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 6 i grafiku 21 (C), uočava se da su u kontrolnoj grupi biljaka vrste *H. heimii* najzastupljenije CA i Ka, a u manjim koncentracijama Na i Io. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, koncentracije CA i Io opadaju, dok koncentracije Ka i Na rastu. Na ovom tretmanu se detektuju Lu i Ir, koji nisu bili prisutni kod kontrolne grupe biljaka. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM, koncentracija CA značajno opada, dok količina Lu, Io i Ir raste. Fenolna jedinjenja koja su bila ispod granice detekcije su Va, Ru, Iq, Qe, i Ap. Kod vrste *H. heimii* najzastupljenije fenolno jedinjenje je Ka, ali je dinamika promene koncentracije svih prisutnih fenolnih jedinjenja značajna u odgovoru ove vrste na stres izazvan NaCl.

Generalno, najmanja količina fenolnih jedinjenja prisutna je kod *H. heimii*, mada je sadržaj fenola veoma raznovrstan. Dominantna jedinjenja su Ka i CA čija se koncentracija menja kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl. Vrste *P. patens* i *E. hungaricus* poseduju veliku količinu fenolnih jedinjenja, ali je sadržaj uniformniji.

Tabela 6. Uticaj egzogenog NaCl na količinu fenolnih jedinjenja kod vrste *H. heimii*, izražena u jedinicama ng/100 mg

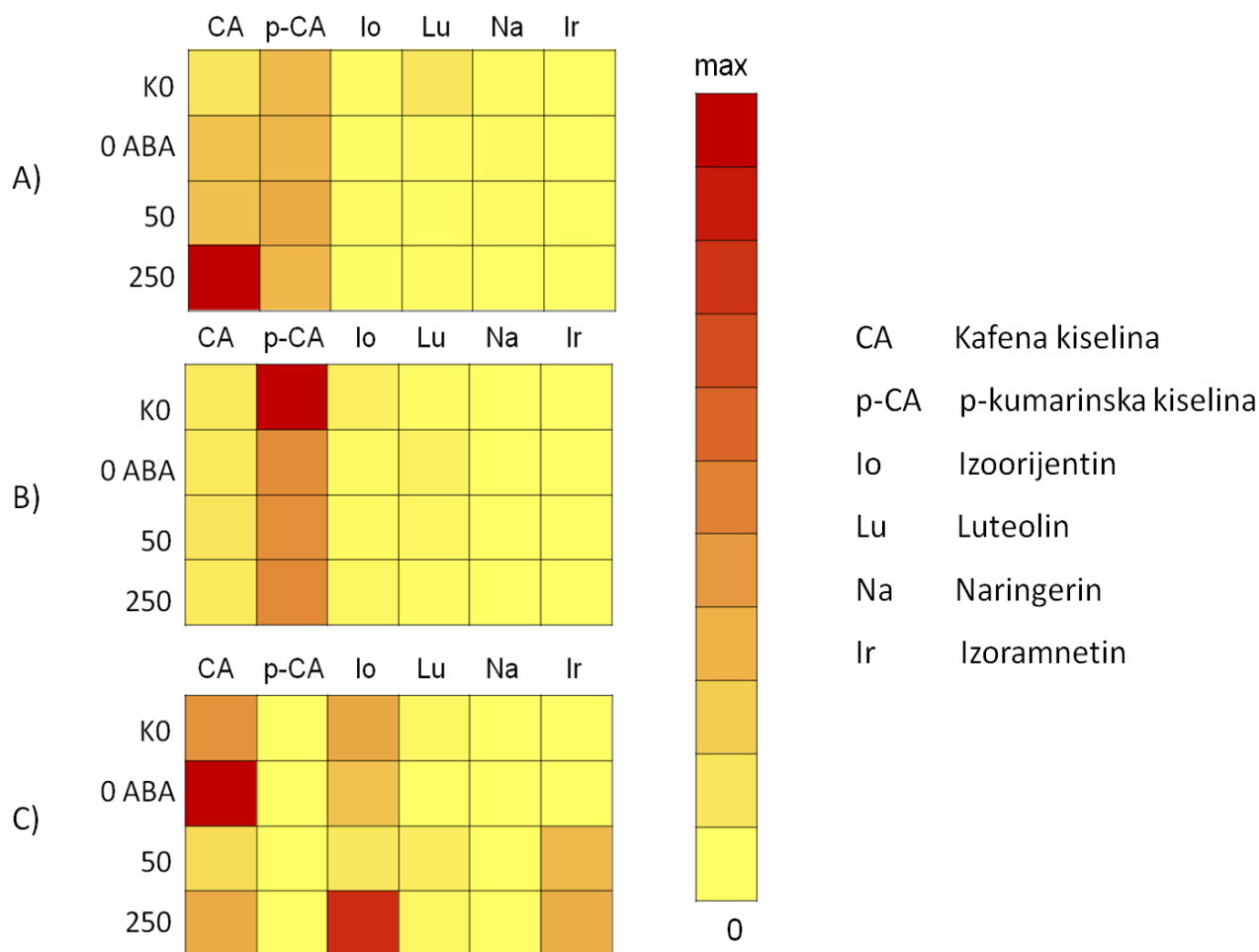
<i>H. heimii</i>	0	50 mM	250 mM
Kafena kiselina	1,0259	0,4210	0,1730
p- Kumarinska kiselina	0,0000	0,0000	0,0000
Vanilin	0,0000	0,0000	0,0000
Rutin	0,0000	0,0000	0,0000
Izokvercitrin	0,0000	0,0000	0,0000
Izoorijentin	0,0033	0,0010	0,0170
Kvercitrin	0,0000	0,0000	0,0000
Luteolin	0,0000	0,1190	0,4300
Naringenin	0,0286	0,0750	0,0000
Apigenin	0,0000	0,0000	0,0000
Izoramnetin	0,0000	0,0110	0,0410
Kamferol	0,7039	2,2490	2,0400

Relativna zastupljenost fenolnih jedinjenja u eksperimentu II je prikazana na grafiku 22. Kao i u eksperimentu I, najzastupljenija jedinjenja kod vrste *P. patens* su CA i p-CA (Grafik 22 A). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA povećava se zastupljenost CA. Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i 50 mM NaCl, ne uočava se značajna razlika u koncentraciji CA i p-CA u odnosu na biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom samo sa ABA. Međutim, kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i 250 mM NaCl, zapaža se značajan porast koncentracije CA kod *P. patens*. Sa druge strane, zastupljenost p-CA je relativno uniformna u kontrolnoj grupi biljaka i u tretmanima. Pored navedenih fenolnih jedinjenja, evidentno je prisustvo Lu u kontroli. Dodatkom ABA i NaCl u hranljivu podlogu, koncentracija Lu se smanjuje kod *P. patens*.

Slično kao i u eksperimentu I, kod vrste *E. hungaricus* najzastupljenija je p-CA, čija je maksimalna koncentracija zabeležena u kontrolnoj grupi biljaka (K0) (Grafik 22 B). Dodatkom ABA i NaCl u hranljivu podlogu, dolazi do smanjenja koncentracije p-CA. Međutim, u poređenju sa ostalim detektovanim fenolnim jedinjenjima, čak i nakon tretmana, koncentracije p-CA je prilično visoka. Može se zapaziti da su ostala detektovana jedinjenja umereno zastupljena u svim tretmanima.



Za razliku od *P. patens* i *E. hungaricus*, najzastupljenija fenolna jedinjenja kod *H. heimii* su CA i Io (Grafik 22 C). U eksperimentima sa *H. heimii* nije zabeležena p-CA za razliku od vrsta iz familije Funariaceae, gde je ovo fenolno jedinjenje najzastupljenije. Treba naglasiti da u ovom eksperimentu nije detektovan Ka za sve vrste, pa stoga ni prikazan na grafiku 22, ali je njegovo prisustvo evidentno kod *H. heimii* (Tabela 9). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA, koncentracija CA raste i dostiže maksimalnu vrednost, dok koncentracija Io neznatno opada. Kada se nakon predtretmana ABA biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, vrednosti CA i Io se smanjuju, dok se značajno povećava koncentracija Ir. Dodatkom 250 mM NaCl u hranljivu podlogu kod *H. heimii* rastu koncentracije CA, Io i Ir, s tim da Io i Ir dostižu maksimalnu vrednost na ovom tretmanu.



Grafik 22. Relativna zastupljenost fenolnih jedinjenja kod vrsta *P. patens* (A), *E. hungaricus* (B) i *H. heimii* (C) u eksperimentu II. Predstavljena su vjedinjenja koja su detektovana kod sve tri ispitivane vrste. Na osnovu intenziteta obojenosti prikazanoj na skali (0-max) tumači se zastupljenost određenog jedinjenja u tretmanu.

Evidentno je prisustvo velikog broja fenolnih jedinjenja kod *P. patens* u eksperimentu II, ali najzastupljenije su p-CA i CA (tabela 7). U većoj količini se detektuje i Lu, ali i druga jedinjenja koja nisu detektovana u eksperimentu I (Iq, Qe i Ap). Egzogena ABA utiče na povećanje koncentracije CA, p-CA, Ru i Na, ali na smanjenje koncentracije svih ostalih detektovanih jedinjenja. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, ukupna količina jedinjenja se neznatno povećava.

Međutim, koncentracije Ru, Io, Iq i Qe rastu, dok koncentracije Lu, Na, Ap i Ir opadaju. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i 250 mM NaCl, detektuje se velika količina fenolnih jedinjenja. Koncentracija CA raste za četiri puta, dok se koncentracija p-CA ne menja. Koncentracije Ru, Iq, Io, Na opadaju, dok koncentracije Qe, Lu, Ap i Ir neznatno rastu kod *P. patens*.

Tabela 7. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na količinu fenolnih jedinjenja kod vrste *P. patens*, izražena u jedinicama ng/100 mg

<i>P. patens</i>	K <sub>0</sub>	0 ABA	50 mM	250 mM
Kafena kiselina	22,2237	51,4118	52,7369	215,7114
p- Kumarinska kiselina	58,9276	61,1235	61,1235	61,2332
Vanilin	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Rutin	0,0000	0,5539	3,1502	0,3804
Izokvercitrin	1,6236	1,1228	2,4113	0,6401
Izoorijentin	3,1425	2,5380	3,2917	1,9900
Kvercitrin	2,8280	1,7014	2,0404	2,0612
Luteolin	21,5989	5,3951	2,3924	4,0572
Naringenin	4,0510	5,0170	4,0231	1,1701
Apigenin	3,3074	0,3882	0,2406	0,4308
Izoramnetin	0,8944	0,8793	0,3005	0,3716

U eksperimentu II, usled dodavanja ABA, sadržaj fenolnih jedinjenja je nešto raznovrsniji kod *E. hungaricus* u poređenju sa eksperimentom I (tabela 8). Egzogeno ABA utiče na smanjenje koncentracije CA, p-CA, Ru, Iq, Io, Qe, dok se neznatno povećava koncentracija Lu, Na i Ir. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i 50 mM NaCl, nema značajnije promene u koncentraciji CA, p-CA, Io, Qe, dok koncentracije ostalih detektovanih jedinjenja neznatno opadaju. Dodavanje 250 mM NaCl u hranljivu podlogu utiče na smanjuje koncentracije CA, Iq, Lu i Ir, dok se koncentracije ostalih fenola povećavaju. Isključivo je na ovom tretmanu moguće detektovati Ap, kao i to da se koncentracije Ru i Io značajno uvećavaju.

Tabela 8. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na količinu fenolnih jedinjenja kod vrste *E. hungaricus*, izražena u jedinicama ng/100 mg

<i>E. hungaricus</i>	K <sub>0</sub>	0 ABA	50 mM	250 mM
Kafena kiselina	6,7986	7,8687	8,9234	6,9004
p- Kumarinska kiselina	84,0679	37,6169	37,0688	39,0422
Vanilin	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Rutin	1,9770	1,6693	0,8362	1,8573
Izokvercitrin	2,2613	1,6302	1,3051	1,2426
Izoorientin	5,0778	1,7335	1,6597	3,2114
Kvercitrin	2,7200	0,9280	0,8836	1,7142
Luteolin	1,0738	4,8293	3,3575	1,1198
Naringenin	0,0000	0,1687	0,0415	0,0806
Apigenin	0,0000	0,0000	0,0000	0,0170
Izoramnetin	0,0000	0,3164	0,1968	0,1897

Egzogeno ABA utiče na povećanje koncentracije fenolnih jedinjenja, posebno CA kod vrste *H. heimii* u eksperimentu II (tabela 9). Količina ukupnih fenolnih jedinjenja kod ove vrste je generalno

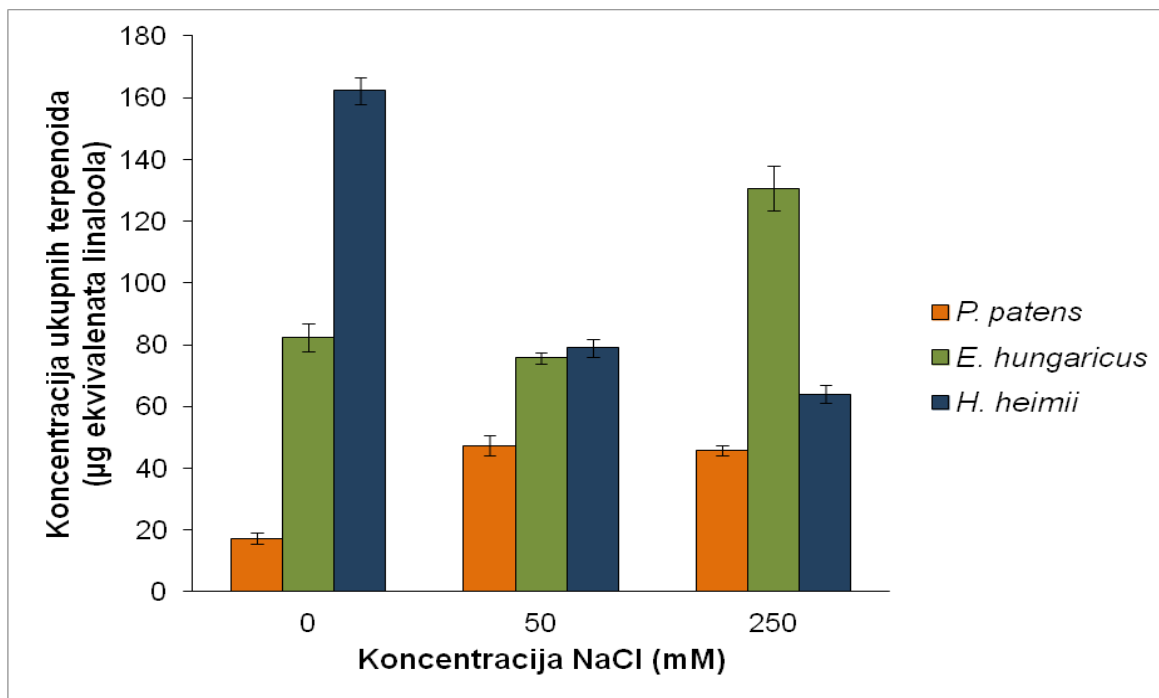
niska. Pored toga, egzogena ABA utiče na smanjenje raznovrsnosti jedinjenja koja je moguće detektovati u ekstraktima *H. heimii*. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i 50 mM NaCl, uočava se smanjenje koncentracije svih detektovanih jedinjenja (CA, Io, Lu, Na), osim Ka, čija koncentracija značajno raste. Kada se u hranljivu podlogu doda 250 mM NaCl, uočava se značajan porast koncentracije CA, Io, Ir i Ka, dok koncentracija Lu opada. Kod vrste *H. heimii* nije detektovana p-CA, kao ni Ru, Iq, Qu i Ap, koji su zastupljeni kod vrsta iz familije Funariaceae.

Tabela 9. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na količinu fenolnih jedinjenja kod vrste *H. heimii*, izražena u jedinicama ng/100 mg

<i>H. heimii</i>	K <sub>0</sub>	0 ABA	50 mM	250 mM
Kafena kiselina	0,7271	1,7070	0,2410	0,5720
p- Kumarinska kiselina	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Vanilin	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Rutin	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Izokvercetrin	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Izoorientin	0,0033	0,002	0,0170	0,0260
Kvercitrin	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Luteolin	0,5829	0,404	0,1660	1,4060
Naringenin	0,0626	0,0000	0,1230	0,0610
Apigenin	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Izoramnetin	0,0000	0,0000	0,0010	0,0080
Kamferol	0,0000	0,0000	0,4810	0,5450

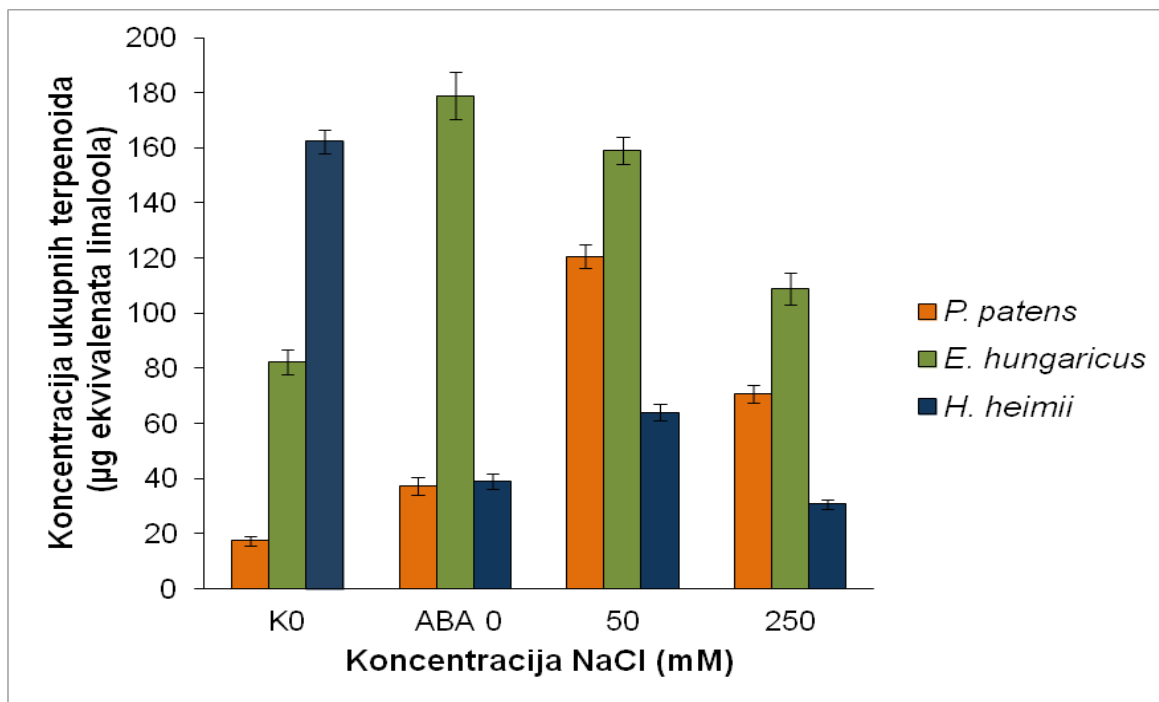
#### 4.3.7. Određivanje ukupnih terpenoida

Terpenoidi su jedna od najzastupljenijih klasa sekundarnih metabolita kod biljaka, sa širokim spektrom uloga. U ovom slučaju se terpeni analiziraju kao potencijalni antioksidansi, odnosno, proučava se da li i u kojoj meri oni doprinose antioksidativnoj zaštiti ispitivanih vrsta briofita. Na osnovu rezultata prikazanih na grafiku 23 uočava se da je najveća količina terpenoida izmerena u kontrolnoj grupi za vrstu *H. heimii*. Najmanji sadržaj ukupnih terpenoida je zabeležen za vrstu *P. patens*. Ukoliko se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, sve tri ispitivane vrste pokazuju različit trend promene ukupnih terpena. Naime, kod vrste *H. heimii*, 50 mM NaCl uslovljava smanjenje sadržaja ukupnih terpenoida, kod vrste *P. patens* vrednosti ukupnih terpena rastu dvostruko, dok kod vrste *E. hungaricus* nema značajnije promene. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, zapaženo je da sadržaj ukupnih terpena značajno raste kod vrste *E. hungaricus*, dok kod vrsta *H. heimii* i *P. patens* neznatno opada.



Grafik 23. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na ukupni sadržaj terpenoida kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I.

Sadržaj ukupnih terpena izmeren nakon eksperimenta II prikazan je na grafiku 24. U poređenju sa kontrolnom grupom biljaka, biljke koje su gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 µM ABA pokazuju različit trend promene sadržaja ukupnih terpena. Kod vrsta *E. hungaricus* i *P. patens*, egzogeno dodata ABA utiče na povećanje koncentracije ukupnih terpena, s tim da je kod *E. hungaricus* povećanje dvostruko. Za razliku od njih, kod *H. heimii* ABA utiče na višestruko smanjenje sadržaja ukupnih terpena. Međutim, kod biljaka vrsta *P. patens* i *H. heimii* gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA dolazi do povećanja sadržaja ukupnih terpena, dok se kod *E. hungaricus* zapaža blago smanjenje. Dalje, kada se biljke sve tri ispitivane vrste gaje na podlozi sa dodatkom 250 mM nakon predtretmana ABA, dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih terpena.

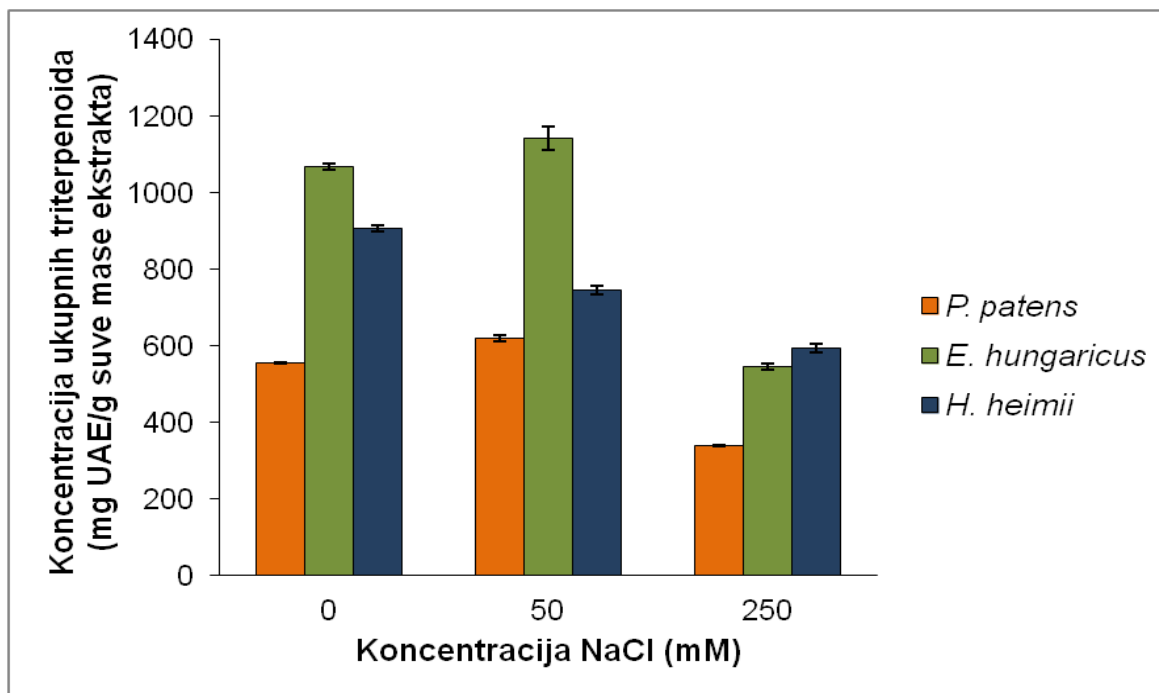


Grafik 24. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na ukupni sadržaj terpenoida kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II.

Koncentracije ukupnih terpena su izuzetno visoke, što ukazuje da su ova jedinjenja bitna komponenta kod ispitivanih vrsta. Njihova dinamična promena kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i/ili NaCl ukazuje na to da su terpenoidi povezani sa mehanizmima odbrane ispitivanih vrsta od stresa izazvanog NaCl.

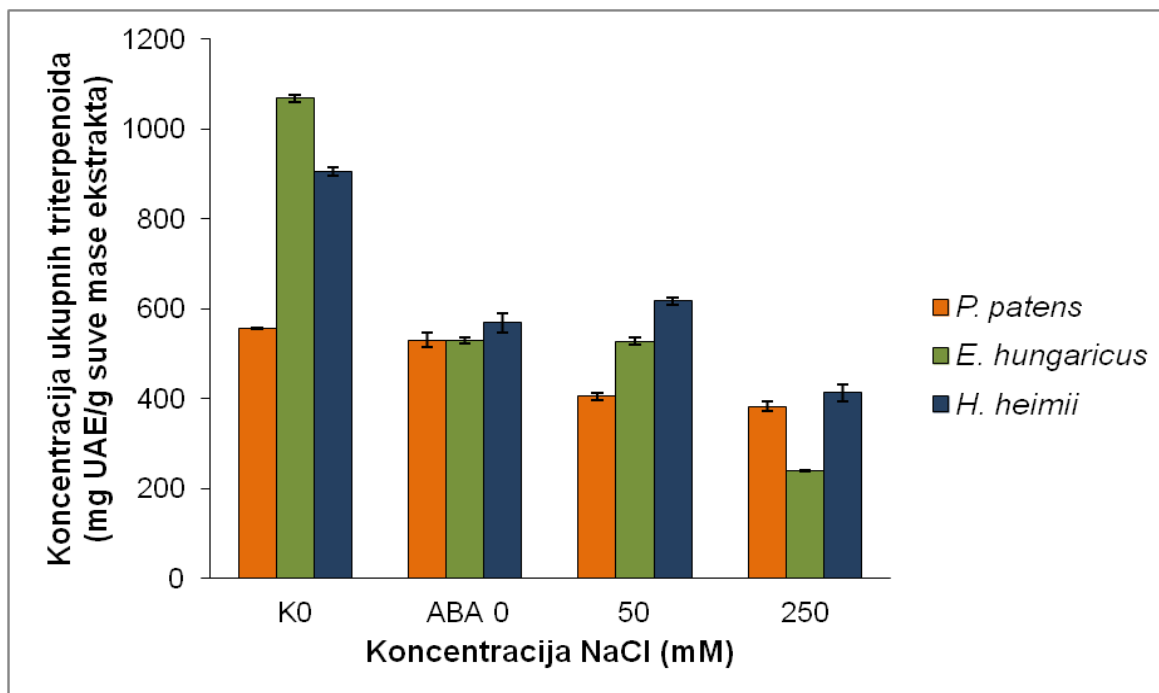
#### 4.3.8. Određivanje ukupnih triterpenoida

Triterpenoidi se svrstavaju u klasu sekundarnih metabolita biljaka, pri čemu ostvaruju različite funkcije. U ovoj disertaciji se triterpeni analiziraju kao potencijalni antioksidansi, odnosno, proučava se da li i u kojoj meri oni doprinose antioksidativnoj zaštiti ispitivanih vrsta mahovina. Koncentracija ukupnih triterpena kod vrste *P. patens* je kod kontrolnih biljaka najniža u poređenju sa brio-halofitnim vrstama *E. hungaricus* i *H. heimii*. Na osnovu rezultata prikazanih na grafiku 25 može se primetiti da *E. hungaricus* ima najveće vrednosti ukupnih triterpena u kontrolnoj grupi biljaka. Međutim, vrsta *H. heimii* u velikoj meri sintetiše i akumulira triterpene. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, vrednosti triterpena se ne menjaju značajno kod vrste *E. hungaricus*, kao ni kod *P. patens*, dok kod vrste *H. heimii* postoji nezntan pad u koncentraciji ukupnih triterpena. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, koncentracija ukupnih triterpena se nezatno smanjuje, što ukazuje na eventualnu razgradnju ili trošenje ovih jedinjenja tokom stresa izazvanog solima (grafik 23). Međutim, treba napomenuti da su kod biljaka gajenih na visokim koncentracijama NaCl vrednosti triterpena prilično visoke, pa se može pretpostaviti da su terpeni zastupljena komponenta kod ispitivanih vrsta, čije se koncentracije ne menjaju značajno prilikom stresa izazvanog solima.



Grafik 25. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na ukupni sadržaj triterpenoida kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I.

Generanlno, u eksperimentu II se zapažaju nešto niže vrednosti koncentracija ukupnih triterpenoida kod sve tri ispitivane vrste mahovina (grafik 26). Egzogeno ABA utiče na smanjenje koncentracije ukupnih triterpena u svim tretmanima u odnosu na kontrolnu grupu biljaka, što je posebno uočljivo kod brio-halofitnih vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*. Za razliku od njih, kod nehalofitne mahovine *P. patens* se uočava stabilni trend promene koncentracije ukupnih triterpena u zavisnosti od primenjene koncentracije NaCl. Kada se biljke gaje na podlozi sa dodatkom ABA i 50 mM NaCl, najveća koncentracija triterpena se uočava kod *H. heimii* u poređenju sa druge dve ispitivane vrste. Naime, nakon istog tretmana se kod vrste *P. patens* koncentracija ukupnih triterpena smanjuje u odnosu na kontrolne grupe biljaka, dok kod vrste *E. hungaricus* koncentracija triterpena ne menja u odnosu na ABA-kontrolu. Značajno smanjenje koncentracije ukupnih triterpena se beleži kod biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom ABA i 250 mM za vrstu *E. hungaricus*, dok se kod vrste *P. patens* koncentracija triterpena ne menja značajno u odnosu na tretman sa ABA i 50 mM NaCl.



Grafik 26. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na ukupni sadržaj triterpenoida kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II.

Kao i u eksperimentu I, zapaža se sličan trend promene vrednosti ukupnih triterpena kod sve tri ispitivane vrste, odnosno, visoka koncentracija NaCl (250 mM) u kombinaciji sa ABA dovodi do znatnog smanjenja ukupnih triterpena kod sve tri ispitivane vrste mahovina. Na osnovu rezultata prikazanih na grafiku 24 za koncentraciju ukupnih terpenoida može se uočiti da se koncentracija triterpena menja na isti način usled dodavanja NaCl i ABA kod brio-halofite *H. heimii*, pa se može pretpostaviti da su kod ove vrste triterpeni značajna komponenta u okviru terpena. Sa druge strane, kod funaroidnih mahovina se može pretpostaviti da osim triterpena postoje i druga terpenoidna jedinjenja, pošto trend promene triterpena ne odgovara u potpunosti trendu promene ukupnih terpena u zavisnosti od dodavanja ABA i NaCl u hranljivu podlogu.

#### 4.4. Određivanje antioksidativnog kapaciteta biljaka

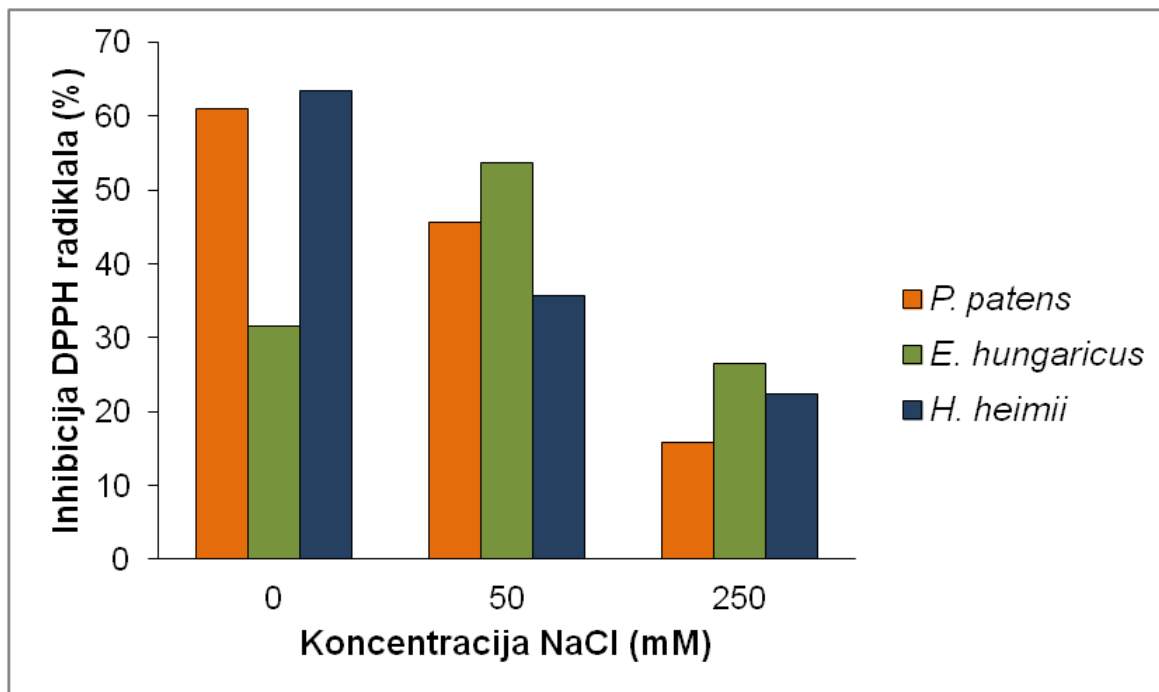
Antioksidativni kapacitet je određivan uz pomoć tri metode: DPPH testa, koji služi za merenje sposobnosti „hvatanja“ DPPH radikala, TRP testa za merenje redukcionog potencijala ekstrakta i testa  $\beta$ -karoten/linolna kiselina, za merenje antioksidativne aktivnosti neenzimske komponente.

##### 4.4.1. Određivanje antioksidativnog kapaciteta biljaka DPPH testom

Rezultati antioksidativnog kapaciteta određivanog DPPH testom u eksperimentu I za sve tri ispitivane vrste su prikazani na grafiku 27. U kontrolnoj grupi biljaka, najveći kapacitet „hvatanja“ DPPH radikala je zabeležen kod brio-halofite *H. heimii*, dok je najniži antioksidativni kapacitet izmeren u ekstraktu vrste *E. hungaricus*. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, kapacitet „hvatanja“ DPPH radikala opada kod vrsta *P. patens* i *H. heimii* za skoro polovinu, dok u značajnoj meri raste kod vrste *E. hungaricus*. Dodavanje visokih koncentracija soli (250 mM NaCl) u hranljivu podlogu utiče na smanjenje antioksidativnog kapaciteta kod sve tri ispitivane vrste. Najveće

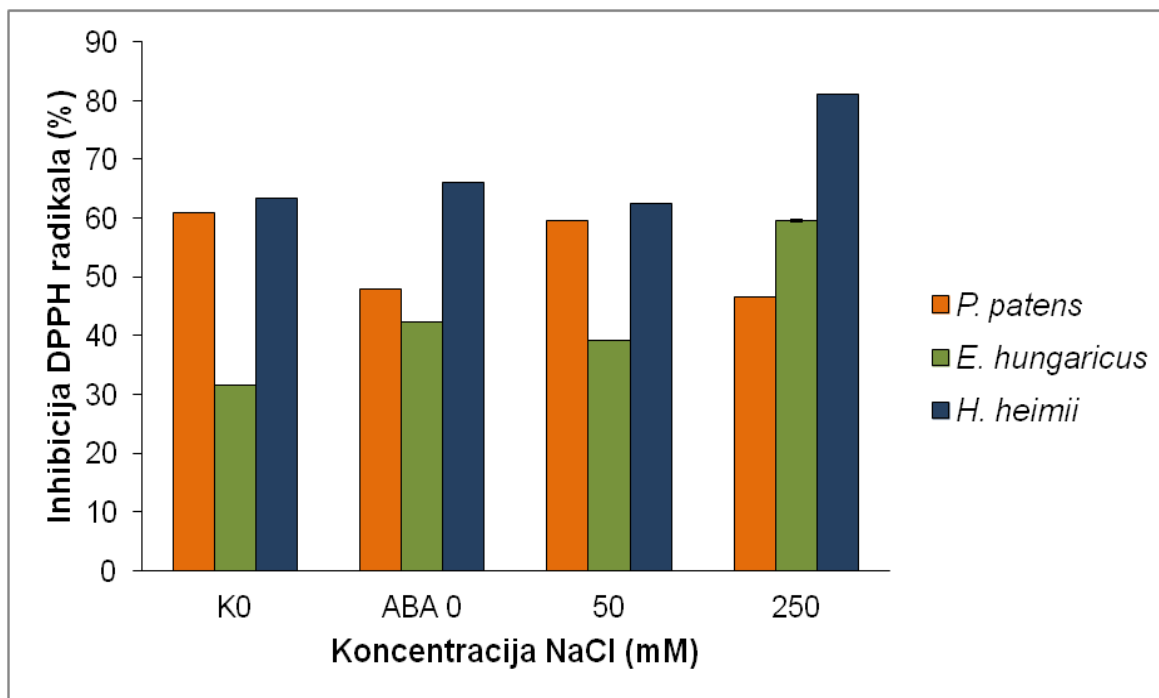


smanjenje antioksidativnog kapaciteta se zapaža u ekstraktu vrste *P. patens*, dok je kod brio-halofita ta vrednost umereno visoka, čak i kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl.



Grafik 27. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na kapacitet „hvatanja“ DPPH radikala kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I.

Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA, rezultati su značajno drugačiji (grafik 28). Sve tri ispitivane vrste pokazuju relativno visok kapacitet „hvatanja“ DPPH radikala ukoliko se ABA doda u hranljivu podlogu. Egzogeni ABA utiče na smanjenje kapaciteta za „hvatanje“ DPPH radikala kod vrste *P. patens*, ali utiče na povećanje antioksidativne sposobnosti kod brio-halofitnih vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*. Navedeno povećanje antioksidativnog kapaciteta je neznatno kod *H. heimii*, ali je izrazito kod *E. hungaricus*. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i 50 mM NaCl, uočava se povećanje antioksidativnog kapaciteta kod *P. patens*, dok se isti smanjuje neznatno kod brio-halofita. Međutim, kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, uočava se suprotan trend. Naime, vrednost antioksidativnog kapaciteta opada kod *P. patens*, dok kod brio-halofita intenzivno raste.

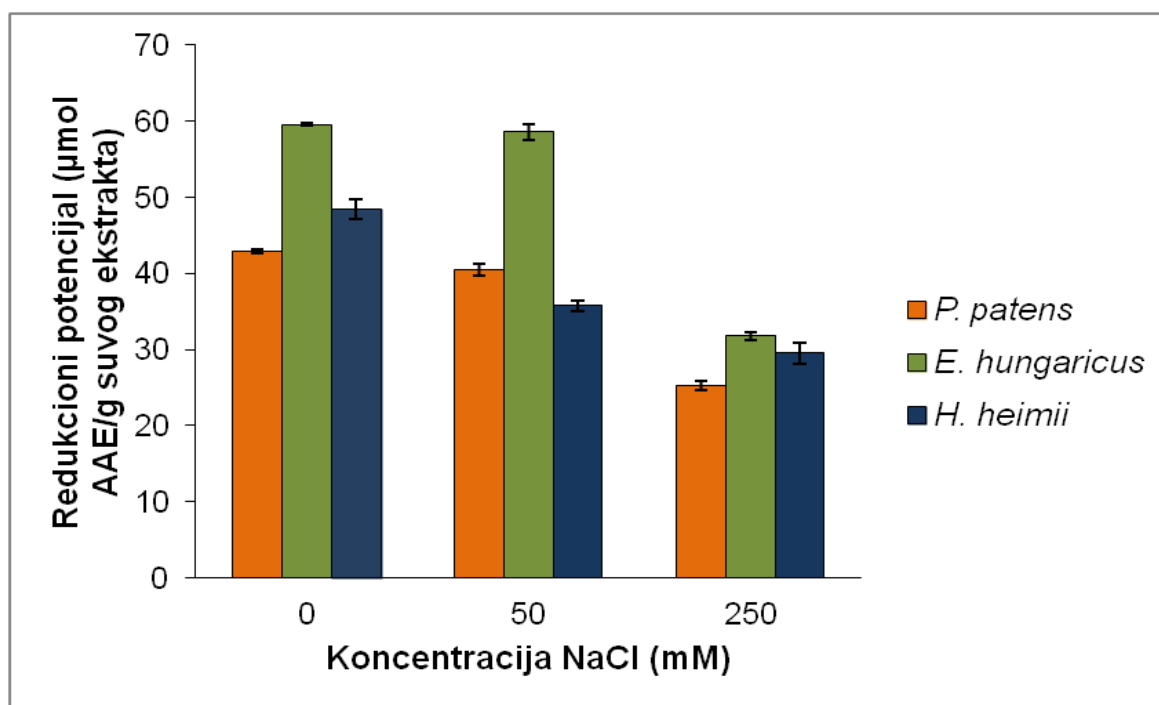


Grafik 28. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na kapacitet „hvatanja“ DPPH radikala kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II.

Generalno, kod vrsta familije Funariaceae (*P. patens* i *E. hungaricus*) moguće je uočiti neujednačen trend promene antioksidativnog kapaciteta korišćenjem DPPH testa u zavisnosti od tretmana NaCl i ABA u eksperimentu I i II. Za razliku od njih, vrsta *H. heimii* pokazuje najveći antioksidativni kapacitet izmeren DPPH testom, posebno kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i 250 mM NaCl. U poređenju sa rezultatima eksperimenta I (grafik 27), ukoliko se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i NaCl, povećava se antioksidativna aktivnost.

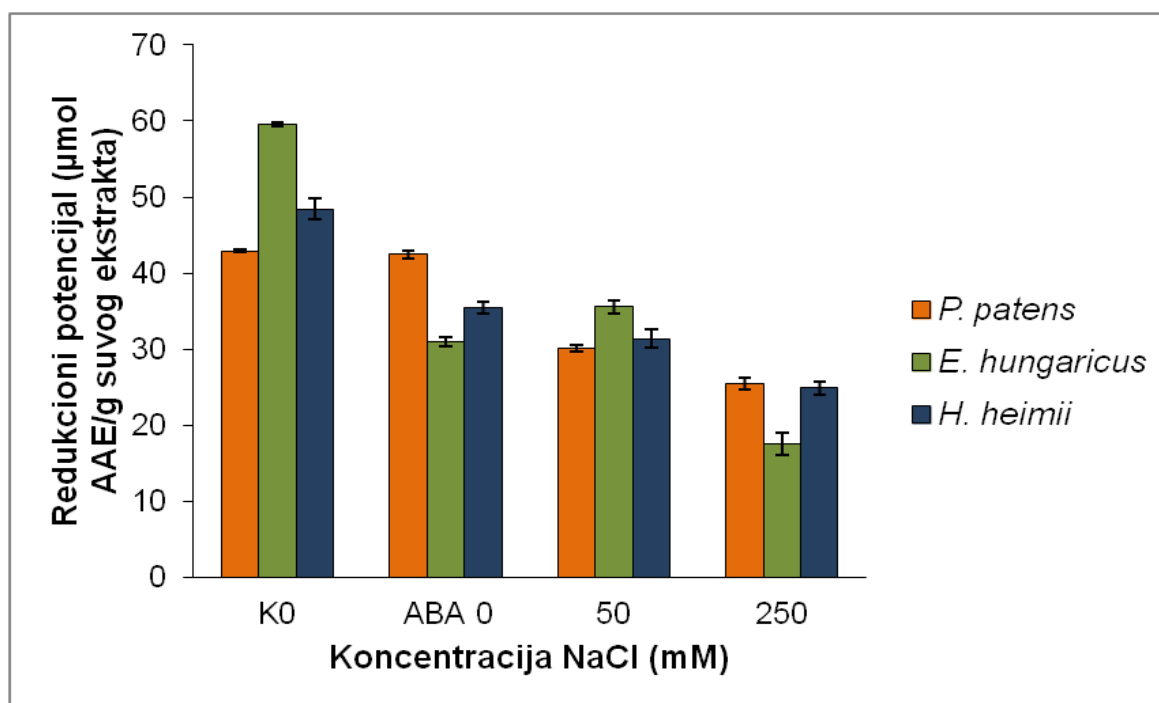
#### 4.4.2. Određivanje redukcionog potencijala

Redukcioni potencijal je mera za sposobnost biljaka da vrše redukciju jona gvožđa, čime se može analizirati antioksidativna aktivnost ekstrakta biljaka. U kontrolnoj grupi biljaka u eksperimentu I (grafik 29) zabeležen je najniži redukcioni potencijal za vrstu *P. patens*, dok je najviši redukcioni potencijal karakterističan za vrstu *E. hungaricus*. Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, ne dolazi do značajnijih promena u vrednosti redukcionog potencijala kod sve tri ispitivane vrste. Međutim, kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl vrednosti redukcionog potencijala opadaju za sve tri ispitivane vrste. Značajno je napomenuti da je potencijal redukcije jona gvožđa prilično visok kod sve tri ispitivane vrste čak i na visokim koncentracijama soli, ukazujući da su biljke i pri intenzivnom stresu sposobne da se izbore sa promenama koje nastaju pod uticajem oksidativnog stresa. Gotovo linearno smanjenje redukcionog potencijala u tretmanima je trend koji se zapaža kod sve tri ispitivane vrste u eksperimentu I (grafik 29).



Grafik 29. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na redukcionu potencijal kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I.

Egzogena ABA utiče na smanjenje vrednosti redukcionog potencijala kod brio-halofitnih vrsta u eksperimentu II, dok se ne uočavaju promene kod vrste *P. patens* u odnosu na kontrolnu grupu biljaka (grafik 30). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i 50 mM NaCl se uočava smanjenje redukcionog potencijala kod vrsta *P. patens* i *H. heimii*. Nasuprot njima, redukcionu potencijal raste kod vrste *E. hungaricus* na datom tretmanu. Generalno, opisane promene u redukcionoj sposobnosti u tretmanima u odnosu na kontrolnu grupu biljaka nisu drastične. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i 250 mM NaCl zapaža se značajno smanjenje redukcionog potencijala kod *E. hungaricus*, dok se kod vrsta *H. heimii* i *P. patens* redukcionu potencijal ne menja drastično. Na osnovu dobijenih rezultata uočavaju se različiti obrasci promene redukcionog potencijala u zavisnosti od ispitivane vrste i tipa tretmana. Najdinamičnije promene su zabeležene kod vrste *E. hungaricus*, dok su po pitanju redukcionog potencijala vrste *P. patens* i *H. heimii* relativno stabilne, jer se kod njih vidi jasan trend gotovo linearnog opadanja vrednosti redukcionog potencijala u zavisnosti od povećane koncentracije NaCl bilo u eksperimentu I (grafik 29), bilo u eksperimentu II (grafik 30).



Grafik 30. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na redukcioni potencijal kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II.

#### 4.4.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti $\beta$ -karoten/linolna kiselina testom

Test  $\beta$ -karoten/linolna kiselina se koristi za demonstraciju očuvanja neenzimske komponente kod biljaka, prvenstveno  $\beta$ -karotena, usled delovanja slobodnih radikala i oksidativnog stresa. U kontrolnoj grupi biljaka u eksperimentu I nije detektovan  $\beta$ -karoten ni kod jedne ispitivane vrste (tabela 10).  $\beta$ -karoten nije detektovan ni kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl. Kod biljaka vrste *P. patens* gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl uočeno je prisustvo  $\beta$ -karotena. Na istom tretmanu, nije zabeležen  $\beta$ -karoten kod brio-halofitnih vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii*. Dobijeni rezultati ne isključuju mogućnost prisustva  $\beta$ -karotena kod ispitivanih vrsta, a koji se moguće nalazi u nedetektabilnim niskim koncentracijama u biljkama.

Tabela 10. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na očuvanje  $\beta$ -karotena kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I. (ND – nije detektovano)

Koncentracija NaCl (mM)	<i>P. patens</i>	<i>E. hungaricus</i>	<i>H. heimii</i>
0	ND	ND	ND
50	ND	ND	ND
250	21,18 %	ND	ND

Međutim, u eksperimentu II su zabeleženi drugačiji rezultati (tabela 11). Kod biljaka vrsta *E. hungaricus* i *H. heimii* gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA moguće je detektovati  $\beta$ -karoten. Dodavanje ABA i NaCl u hranljivu podlogu utiče na prisustvo  $\beta$ -karotena kod sve tri ispitivane vrste. Ovakav rezultat je donekle očekivan, s obzirom na to da ABA utiče na povećanje tolerancije biljaka na oksidativni stres. Pretpostavlja se da je jedan od mogućih načina regulisanja

odgovora biljaka na stres izazvan solima uslovljen delovanjem ABA na sintezu i akumulaciju karotenoida.

Tabela 11. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na očuvanje  $\beta$ -karotena kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II. (ND – nije detektovano)

Koncentracija NaCl (mM)	<i>P. patens</i>	<i>E. hungaricus</i>	<i>H. heimii</i>
K0	ND	ND	ND
ABA 0	ND	> 100 %	18,75 %
50	> 100 %	> 100 %	> 100 %
250	> 100 %	> 100 %	> 100 %

#### 4.5. Analiza sadržaja šećera i šećernih alkohola HPLC - PAD metodom

U ovoj doktorskoj disertaciji kvantifikovani su šećeri kod sve tri ispitivane vrste mahovna korišćenjem komercijalnih standarda za ugljene hidrate: monosaharidi - arabinoza, glukoza, fruktoza, riboza, galaktoza i ksiloza, disaharidi - saharoza, maltoza, trehaloza, turanoza, izomaltoza i melibioza, trisaharidi - izomaltotrioza, maltotrioza i panoza, oligosaharidi - rafinoza i stahioza i šećerni alkoholi - manitol, eritritol, galaktitol, glicerol i sorbitol.

Kod vrste *P. patens* najzastupljeniji šećeri su mohosaharidi glukoza, fruktoza, riboza i disaharid saharoza (tabela 12, grafik 31 A). Kod kontrolne grupe biljaka detektovana je najveća koncentracija fruktoze i glukoze, ali su u većoj meri zasupljeni i saharoza, riboza, maltoza i sorbitol (tabela 12). Nešto manji udeo čine galaktoza, galaktitol, trehaloza, arabinoza, turanoza i izomaltoza, dok su ostali detektovani šećeri zastupljeni u koncentracijama nižim od 5 g/kg. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl uočava se povećanje koncentracije glukoze, galaktoze, galaktitola, maltoze, izomaltoze, riboze i trehaloze u većoj meri. Dvostruko smanjenje koncentracije je evidentno za šećerne alkohole sorbitol i manitol, dok se neznatno smanjuje koncentracija fruktoze, saharoze, maltotrioze, rafinoze i drugih šećera koji su zastupljeni u manjoj meri. Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl zapaženo je povećanje koncentracije fruktoze, glukoze, arabinoze i rafinoze, dok se koncentracija svih ostalih testiranih šećera smanjuje, što je posebno uočljivo za saharozu i trehalozu, čija se koncentracija smanjuje trostruko (tabela 12). Od šećernih alkohola, kod *P. patens* najzastupljeniji su sorbitol i galaktitol. Generalno, kod ove grupe biljaka koncentracija ukupnih šećera neznatno opada u odnosu na kontrolu, pa se pretpostavlja da se šećeri troše u stresu izazvanom NaCl. Šećeri identifikovani u najvećoj koncentraciji su mohosaharidi, disaharidi i sorbitol. Međutim, od posebnog značaja su šećeri čija se koncentracija povećava ili smanjuje usled dodavanja NaCl u podlogu.

Tabela 12. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na koncentraciju i sadržaj šećera kod vrste *P. patens* u eksperimentu I, izražena u jedinicama g/kg

	<i>P. patens</i>	0	50 mM	250 mM
Monosaharidi	Arabinoza	10,9789	6,3186	10,0952
	Glukoza	324,0052	370,5038	378,8185
	Fruktoza	346,6193	298,1900	314,6580
	Riboza	74,3739	77,8339	60,6571
	Galaktoza	24,3002	72,4835	63,5672
	Ksiloza	1,6846	1,372382	1,0773
Disaharidi	Saharoza	77,1611	76,8044	21,7611
	Maltoza	51,7731	53,8888	41,9381
	Trehaloza	18,2559	48,3748	18,4931
	Turanoza	10,5340	7,0905	5,7952
	Gentiobioza	0,3815	0,2704	0,1656
	Izomaltoza	8,5842	9,2662	7,2738
Trisaharidi	Melibioza	1,1934	1,1174	0,9394
	Izomaltotrioza	4,6585	5,1214	4,1239
	Maltotrioza	3,2614	2,5958	2,0785
Oligosaharidi	Panoza	0,2851	0,2251	0,1064
	Rafinoza	2,9353	1,9885	2,5112
Šećerni alkoholi	Stahioza	0,7140	0,6895	0,5913
	Manitol	1,0543	0,5029	0,3302
	Erititrol	2,1292	2,6592	2,05192
	Galaktitol	19,9205	27,9943	25,3401
	Glicerol	0,7674	0,7545	0,5653
	Sorbitol	50,5007	26,3044	16,4139

U kontrolnoj grupi biljaka kod vrste *E. hungaricus* zabeležena je najveća koncentracija fruktoze, glukoze, galaktoze i saharoze, dok se u značajno manjoj meri u poređenju sa vrstom *P. patens* nalaze sorbitol, maltoza, trehaloza, arabinoza, kao i ostali detektovani šećeri (tabela 13, grafik 31 B). Generalno, vrsta *E. hungaricus* sintetise manje količine šećera u kontrolnoj grupi u poređenju sa *P. patens*. Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl zapaža se značajno smanjenje koncentracija fruktoze, glukoze, galaktoze, riboze, a posebno disaharida saharoze. Međutim, uočava se značajan porast sorbitola, trehaloze, turanoze, maltoze, gentiobioze i u manjoj meri rafinoze. Uopšteno, ukupna koncentracija šećera kod ove grupe biljaka opada u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl uočava se porast koncentracije fruktoze, glukoze, galaktoze, sorbitola, a posebno saharoze, riboze, izomaltoze, manitola, erititola i ksiloze, što značajno doprinosi povećanju koncentracije ukupnih šećera kod vrste *E. hungaricus*. Od šećernih alkohola najzastupljeniji su sorbitol i galaktitol, kao što je zapaženo i kod *P. patens*. Međutim, značajno je napomenuti dvostruki porast koncentracije sorbitola kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, kao i porast koncentracije ostalih detektovanih šećernih alkohola, što je značajno različit rezultat od onog dobijenog za vrstu *P. patens* (tabela 12). Ukupna koncentracija šećera kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl je veća u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka, pa se može zaključiti da kod ove vrste dolazi do sinteze i akumulacije šećera u odgovoru na stres izazvan NaCl. Pored toga, zapaža se značajan porast koncentracija izomaltoze, riboze i sorbitola kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, šećera koji su u kontrolnoj grupi biljaka bili prisutni u niskim koncentracijama. Ovakvi

rezultati ukazuju na to da *E. hungaricus* akumulira drugačije tipove šećera u odnosu na *P. patens* kada se nađe u sredini opterećenoj sa NaCl.

Tabela 13. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na koncentraciju i sadržaj šećera kod vrste *E. hungaricus* u eksperimentu I, izražena u jedinicama g/kg

	<i>E. hungaricus</i>	0	50 mM	250 mM
Monosaharidi	Arabinoza	8,0397	11,1813	11,0538
	Glukoza	276,3731	245,4969	306,5669
	Fruktoza	311,1426	208,6150	250,6346
	Riboza	18,4266	13,3063	46,1684
	Galaktoza	79,6891	55,0784	102,4558
	Ksiloza	2,9452	0,3457	1,3354
Disaharidi	Saharoza	74,9937	3,0628	98,8148
	Maltoza	26,4602	32,6868	39,4526
	Trehaloza	6,7015	18,1583	11,6908
	Turanoza	4,9815	9,4328	3,4894
	Gentiobioza	0,0807	0,1668	0,0731
	Izomaltoza	8,0517	7,0809	48,5381
Trisaharidi	Melibioza	0,8399	0,2123	0,1185
	Izomaltotrioza	3,2416	3,7128	3,2003
	Maltotrioza	1,7700	1,5782	1,0953
Oligosaharidi	Panoza	0,0601	0,0645	0,0496
	Rafinoza	2,5741	2,7410	2,0145
Šećerni alkoholi	Stahioza	0,5423	0,8530	0,9530
	Manitol	0,9198	0,4737	2,8062
	Erititrol	1,1938	1,2052	1,7717
	Galaktitol	10,7501	10,8521	15,9536
	Glicerol	0,2837	0,1459	0,9086
	Sorbitol	33,5146	58,8905	63,8587

U poređenju sa vrstama familije Funariaceae kod kontrolne grupe biljaka vrste *H. heimii* zabeležena je najveća koncentracija ukupnih šećera i šećernih alkohola, gde su najviše zastupljeni fruktoza, glukoza, saharoza, galaktoza, riboza, maltoza i sorbitol (tabela 14, grafik 31 C). U poređenju sa brio-halofitom *E. hungaricus*, u većoj koncentraciji su prisutni saharoza, galaktoza, sorbitol, trehaloza, riboza, maltoza, arabinoza, izomaltoza i manitol. Međutim, za razliku od *E. hungaricus* i *P. patens*, kod *H. heimii* se detektuje manje glukoze, fruktoze i ksiloze. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl uočava se povećanje koncentracije šećera kao što su glukoza, sorbitol, trehaloza, fruktoza, riboza, manitol i ksiloza, dok se značajno smanjuju koncentracije arabinoze, saharoze, galaktoze, maltoze, izomaltoze i izomaltotrioze. Kod ove grupe biljaka značajno je napomenuti višestruko povećanje koncentracija sorbitola i trehaloze, koji u najvećoj meri doprinose povećanju koncentracije ukupnih šećera kod *H. heimii*. Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, koncentracija ukupnih šećera samo neznatno opada. Međutim, zapažen je porast koncentracija erititrola, arabinoze, glukoze, saharoze, fruktoze, turanoze, galaktitola, maltoze, melibioze, rafinoze – šećera čija je koncentracija opadala kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl. Kod ove grupe biljaka se smanjuje značajno koncentracija sorbitola i trehaloze, čija je koncentracija dostizala maksimalne vrednosti kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, što je rezultat sličan dobijen za vrstu *P. patens*. Značajno je

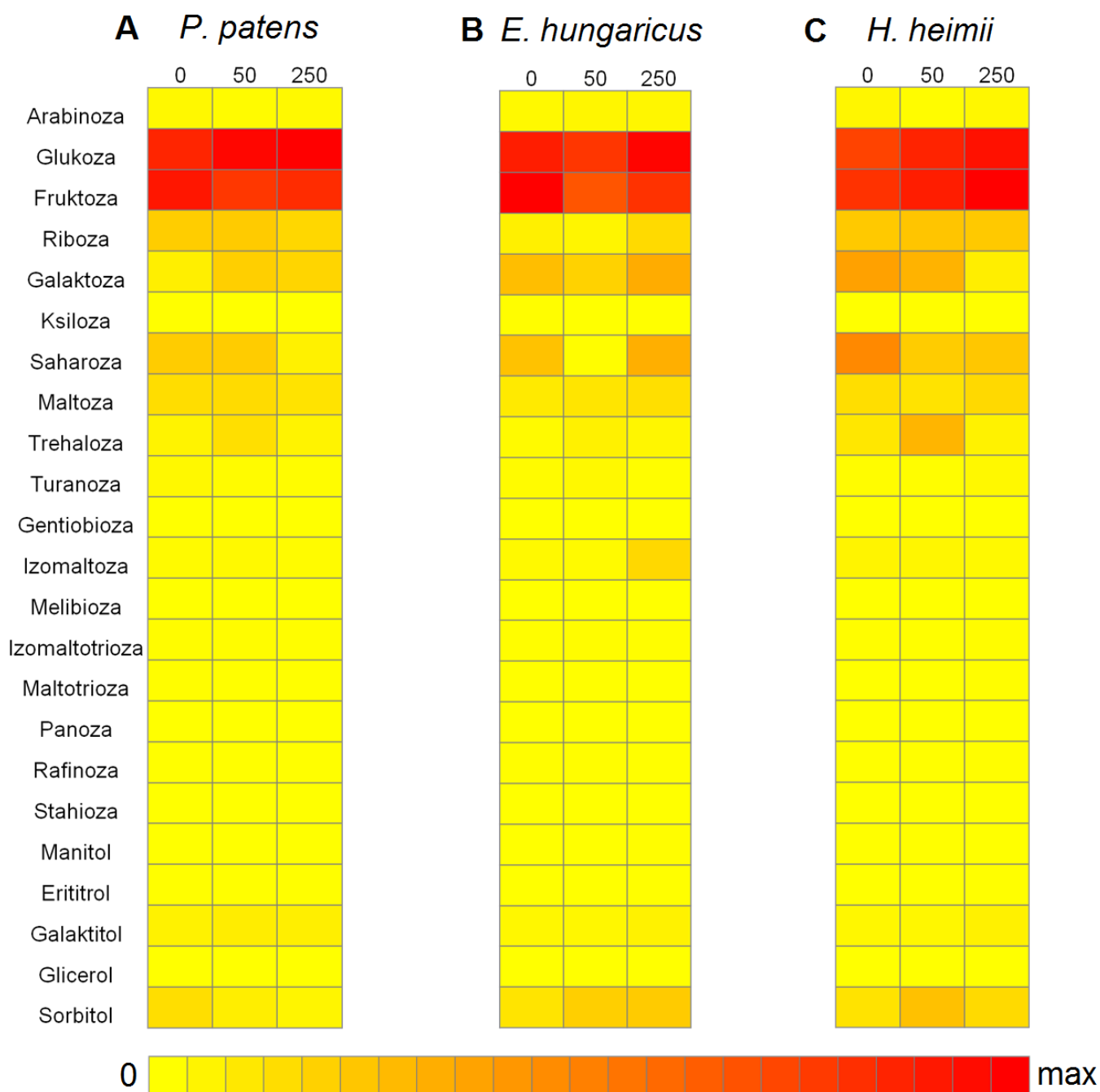


napomenuti gotovo linearno povećanje koncentracije glukoze i fruktoze usled povećanja koncentracije NaCl u hranljivoj poldozi. Promena koncentracije ovih šećera ukazuje na aktivnost fotosinteze, pa se pretpostavlja da je i u uslovima povećane koncentracije NaCl produkcija metabolita povećana. Uopšteno, vrsta *H. heimii* poseduje kvalitativno više različitih grupa šećera sa većom koncentracijom u poređenju sa druge dve vrste.

Tabela 14. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na koncentraciju i sadržaj šećera kod vrste *H. heimii* u eksperimentu I, izražena u jedinicama g/kg

	<i>H. heimii</i>	0	50 mM	250 mM
Monosaharidi	Arabinoza	12,0144	4,2145	10,6935
	Glukoza	249,3469	292,5176	315,5811
	Fruktoza	272,0825	299,8060	337,6072
	Riboza	71,6576	77,7541	72,4401
	Galaktoza	124,7297	101,2440	23,6684
	Ksiloza	1,2723	2,6872	1,6407
Disaharidi	Saharoza	156,3293	68,4688	75,1549
	Maltoza	43,7512	37,1600	50,4270
	Trehaloza	32,2065	99,1889	17,7812
	Turanoza	4,7564	3,6922	10,2601
	Gentiobioza	0,0225	0,0312	0,3716
	Izomaltoza	15,5038	12,6102	8,36103
Trisaharidi	Melibioza	0,3942	0,3521	1,1624
	Izomaltotrioza	3,1632	2,4782	4,5374
	Maltotrioza	1,2724	1,1243	3,1766
Oligosaharidi	Panoza	0,0156	0,0126	0,2776
	Rafinoza	2,5895	2,3689	2,8590
Šećerni alkoholi	Stahioza	0,9630	0,8874	0,8625
	Manitol	1,9947	2,2769	1,0268
	Erititrol	1,2824	0,9043	2,0738
	Galaktitol	11,5465	11,3338	19,4025
	Glicerol	0,2666	0,5203	0,7474
	Sorbitol	38,3104	82,7843	49,1876

Iako sve tri ispitivane vrste u najvećoj meri akumuliraju monosaharide u eksperimentu I, postoji značajna razlika u koncentraciji drugih tipova šećera, kao i u načinu promene koncentracija usled dodavanja NaCl u hranljivu podlogu, što sve ukazuje da ove vrste poseduju različite mehanizme kojima kontrolišu sintezu i akumulaciju šećera kada na njih deluje stres izazvan NaCl.



Grafik 31. Relativna zastupljenost ugljenih hidrata kod vrsta *P. patens* (A), *E. hungaricus* (B) i *H. heimii* (C) u eksperimentu I. 0 – kontrolna grupa biljaka, 50 – biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, 250 - biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl. Predstavljena su sva detektovana jedinjenja. Na osnovu intenziteta obojenosti prikazanoj na skali (0-max) tumači se zastupljenost određenog jedinjenja u tretmanu.

Kada se biljke vrste *P. patens* gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA (ABA 0), nezantno se smanjuje koncentracija ukupnih šećera, a prvenstveno sorbitola, arabinoze, fruktoze, turanoze, maltotrioze, maltoze, riboze i nezantno glukoze, saharoze, manitola i ksiloze (tabela 15, grafik 32 A). Sa druge strane, zapaža se značajno povećanje koncentracije trehaloze, galaktoze i galaktitola. Kada se

biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA, koncentracije šećera se menjaju tako da se povećava koncentracija arabinoze, glukoze, fruktoze, šećera čija je koncentracija opadala usled dodavanja ABA u hranljivu podlogu, dok se koncentracija ostalih detektovanih šećera u manjoj ili većoj meri smanjuje. Uopšteno, zbog porasta koncentracija navedenih šećera, koncentracija ukupnih šećera raste (tabela 15). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM nakon predtretmana ABA, koncentracija šećera neznatno se smanjuje, što je posledica smanjenja koncentracije trehaloze, glukoze, galaktitola, riboze, maltoze i maltotrioze. Nasuprot njima, značajno raste koncentracija saharoze, frukoze, sorbitola, galaktoze i ksiloze, što ukazuje da su ovi šećeri aktivni učesnici mehanizma tolerancije na povećane koncentracije NaCl u podlozi ukoliko se biljke predtreatiraju sa ABA. Moguće je da ABA pospešuje njihovu akumulaciju kod vrste *P. patens*. U poređenju sa eksperimentom I, kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA pre prebacivanja na hranljivu podlogu sa dodatkom 250 mM NaCl, dolazi do sinteze saharoze i sorbitola, koji su se kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl bez predtretmana smanjivali. Pored toga, ABA dovodi do smanjenja koncentracije maltoze, trehaloze, riboze i galaktitola kod iste grupe biljaka, u odnosu na iste grupe biljaka u eksperimentu I.

Tabela 15. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na koncentraciju i sadržaj šećera kod vrste *P. patens* u eksperimentu II, izražena u jedinicama g/kg

	<i>P. patens</i>	K <sub>0</sub>	ABA 0	50 mM	250 mM
Monosaharidi	Arabinoza	10,9789	5,3076	10,2163	8,634
	Glukoza	324,0052	311,2232	383,3644	296,8248
	Fruktoza	346,6193	250,4796	318,4339	334,1672
	Riboza	74,3738	65,3805	61,3849	19,7901
	Galaktoza	24,3002	60,8861	64,3300	85,5861
	Ksiloza	1,6845	1,1528	1,0902	3,1631
Disaharidi	Saharoza	77,1611	64,5156	22,0222	80,5432
	Maltoza	51,7731	45,2666	42,4413	28,4182
	Trehaloza	18,2558	40,6348	18,7149	7,1974
	Turanoza	10,5340	5,9560	5,8647	5,3501
	Gentiobioza	0,3815	0,2271	0,1675	0,0867
	Izomaltoza	8,5842	7,7836	7,3611	8,6475
Trisaharidi	Melibioza	1,1934	0,9386	0,9506	0,9021
	Izomaltotrioza	4,6585	4,3020	4,1733	3,4816
	Maltotrioza	3,2614	2,1805	2,1035	1,9010
Oligosaharidi	Panoza	0,2851	0,1890	0,1076	0,0645
	Rafinoza	2,9353	2,7856	2,4410	2,6589
Šećerni alkoholi	Stahioza	0,7140	0,5705	0,6250	0,5531
	Manitol	1,0543	0,4225	0,3342	0,9879
	Eritritol	2,1292	2,2337	2,0765	1,2822
	Galaktitol	19,9204	23,5152	25,6442	11,5456
	Glicerol	0,7674	0,6338	0,5721	0,3046
	Sorbitol	50,5006	22,0957	16,6108	35,9946

Za razliku od vrste *P. patens*, egzogena ABA dovodi do značajnijeg smanjenja koncentracije šećera kod vrste *E. hungaricus* (tabela 16, grafik 32 B). Prvenstveno dolazi do smanjenja glukoze, galaktoze, riboze, izomaltoze i maltoze, a posebno saharoze, fruktoze, ksiloze i galaktoze. ABA utiče na porast koncentracije šećera kao što su sorbitol, trehaloza, turanoza, maltoza, rafnoza i stahioza. Kod

biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA zapaža se značajan porast koncentracije ukupnih šećera, posebno glukoze, saharoze, fruktoze, sorbitola, galaktitola, galaktoze, riboze, izomaltoze, maltoze, manitola i ksiloze. Kod ove grupe biljaka opada koncentracija trehaloze, turanoze, maltotrioze i rafinoze. Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA zapaža se smanjenje koncentracije sorbitola, glukoze, galaktitola, izomaltoze i manitola, što doprinosi neznatnom smanjenju koncentracije ukupnih šećera. Za razliku od njih povećava se koncentracija trehaloze, saharoze, turanoze, galaktoze, riboze, rafinoze – šećera čija je koncentracija u predhodnoj grupi bila smanjena usled delovanja 50 mM NaCl i ABA. Generalno se zapaža trend da se usled dodavanja NaCl i ABA u hranljivu podlogu koncentracija određenih šećera smanjuje, dok se sa povećanjem koncentracije NaCl u podlozi povećava koncentracija istih šećera. Dinamična promena u koncentraciji nekog šećera može ukazivati na to koji šećeri igraju bitnu ulogu u odgovoru biljaka na stres izazvan NaCl.

Tabela 16. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na koncentraciju i sadržaj šećera kod vrste *E. hungaricus* u eksperimentu II, izražena u jedinicama g/kg

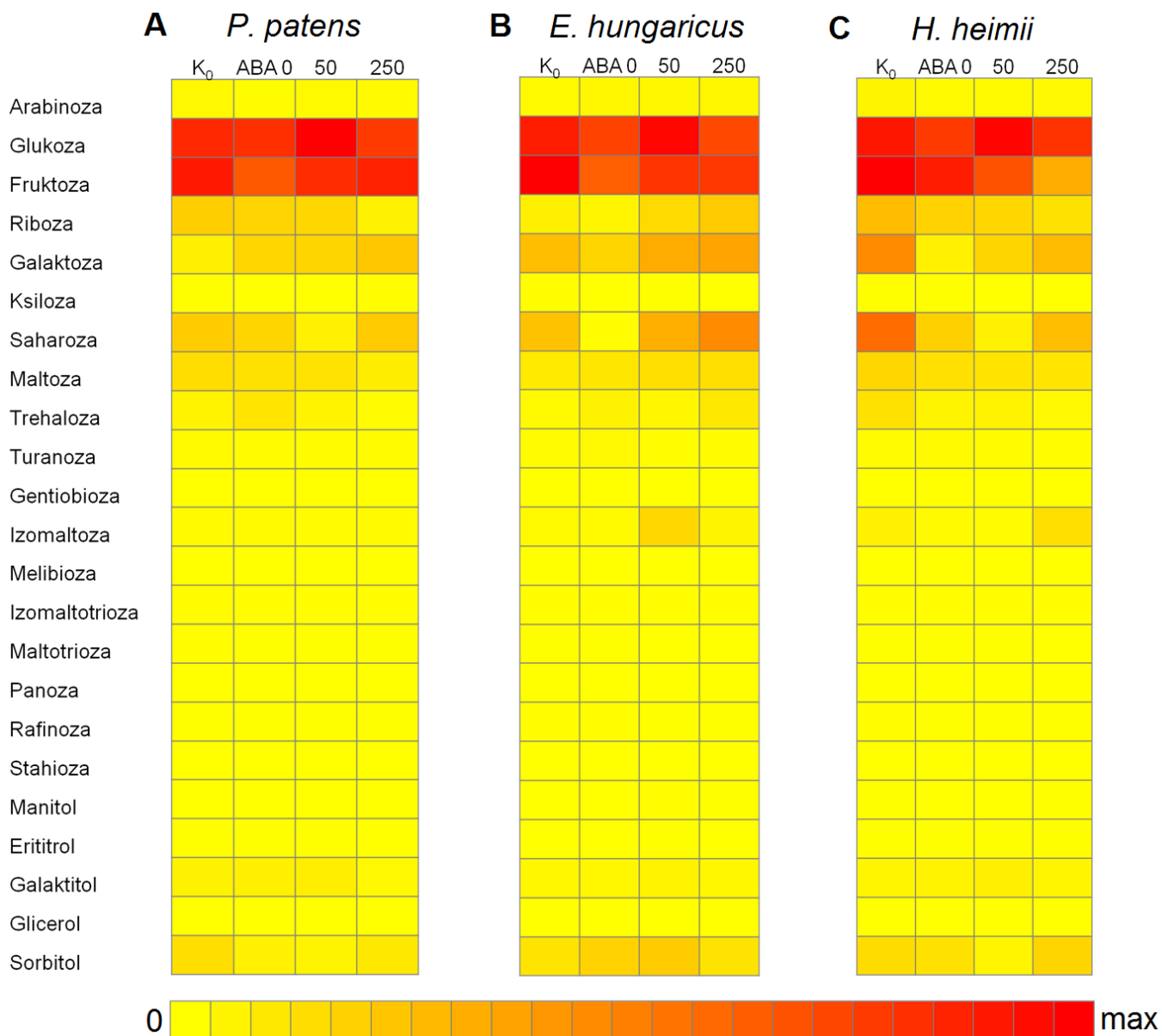
	<i>E. hungaricus</i>	K <sub>0</sub>	ABA 0	50 mM	250 mM
Monosaharidi	Arabinoza	8,0397	10,5104	10,9432	10,8009
	Glukoza	276,3731	230,7671	303,5012	224,1629
	Fruktoza	311,1426	196,0981	248,1283	244,6021
	Riboza	18,4266	12,5079	45,7067	64,4201
	Galaktoza	79,6891	51,7737	101,4313	112,1320
	Ksiloza	2,9452	0,3249	1,3221	1,1438
Disaharidi	Saharoza	74,9937	2,8790	97,8266	140,5400
	Maltoza	26,4602	30,7256	39,0581	39,3324
	Trehaloza	6,7015	17,0687	11,5738	28,9537
	Turanoza	4,9815	8,8668	3,4545	4,2759
	Gentiobioza	0,0807	0,1568	0,0724	0,0203
	Izomaltoza	8,0517	6,6561	48,0527	13,9379
Trisaharidi	Melibioza	0,8399	0,1995	0,1173	0,3544
	Izomaltotrioza	3,2417	3,4900	3,1682	2,8437
	Maltotrioza	1,7700	1,4836	1,0844	1,1438
Oligosaharidi	Panoza	0,0600	0,0606	0,0491	0,0140
	Rafinoza	2,5741	2,8741	2,2254	2,3562
Šećerni alkoholi	Stahioza	0,5423	0,6530	0,7741	0,8734
	Manitol	0,9198	0,4453	2,7781	1,7932
	Erititrol	1,1938	1,1329	1,7540	1,1528
	Galaktitol	10,7501	10,2010	15,7941	10,3803
	Glicerol	0,2836	0,1372	0,8995	0,2397
	Sorbitol	33,5145	55,3571	63,2201	34,4411

Kod vrste *H. heimii* ABA utiče na smanjenje koncentracije ukupnih šećera, prvenstveno jer se višestruko smanjuje koncentracija galaktoze, saharoze, trehalze, izomaltoze, a u manjoj meri se smanjuje koncentracija sorbitola, manitola, arabinoze, glukoze, fruktoze i drugih šećera (tabela 17, grafik 32 C). Za razliku od njih, beleži se neznatno povećanje koncentracija turanoze, melibioze, maltotrioze, panoze i šećernih alkohola. U poređenju sa vrstama *P. patens* i *E. hungaricus*, ABA kod *H. heimii* najviše utiče na smanjenje koncentracije šećera. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA, dolazi do povećanja koncentracija glukoze,

galaktoze, trehaloze i maltoze, dok se koncentracije šećernih alkohola manitola i sorbitola značajno smanjuju, kao i fruktoze, saharoze i riboze. Sa druge strane, kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA, zapaža se povećanje koncentracije ukupnih šećera, a primarno zbog povećanja koncentracije saharoze, izomaltoze, manitola i sorbitola. Koncentracije ostalih šećera se smanjuju neznatno. Može se pretpostaviti da kod *H. heimii* ABA utiče na akumulaciju navedenih šećera kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa visokim koncentracijama NaCl, dok se kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom niskih ili umerenih koncentracija NaCl dominantno nalaze drugi tipovi šećera. Za razliku od eksperimenta I, kod biljaka predtretiranih sa ABA zapaža se povećanje galaktoze, saharoze, izomaltoze i sorbitola, kao što je opisano, ali opada značajno koncentracija trehaloze, maltoze i galaktitola, koji su bili značajna komponenta u eksperimentu I kod vrste *H. heimii*.

Tabela 17. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na količinu šećera kod vrste *H. heimii* u eksperimentu II, izražena u jedinicama g/kg

	<i>H. heimii</i>	K <sub>0</sub>	ABA 0	50 mM	250 mM
Monosaharidi	Arabinoza	12,0144	7,1582	7,1393	7,8525
	Glukoza	249,3469	211,2485	267,8989	217,7809
	Fruktoza	272,0825	242,6598	185,4374	89,1740
	Riboza	71,6576	48,4911	42,8964	32,7974
	Galaktoza	124,7297	15,8435	44,9545	72,7832
	Ksiloza	1,2723	1,0983	0,7618	0,9486
Disaharidi	Saharoza	156,3293	50,3083	15,3893	70,1967
	Maltoza	43,7512	33,7556	29,6585	28,0266
	Trehaloza	32,2065	11,9026	13,0782	8,3049
	Turanoza	4,7563	6,8681	4,0983	2,4788
	Gentiobioza	0,0226	0,2487	0,1171	0,0519
	Izomaltoza	15,5038	5,5968	5,1440	34,4808
Trisaharidi	Melibioza	0,3942	0,7781	0,6643	0,0841
	Izomaltotrioza	3,1632	3,0373	2,9163	2,2734
	Maltotrioza	1,2723	2,1264	1,4699	0,7781
Oligosaharidi	Panoza	0,0156	0,1858	0,0752	0,0352
	Rafinoza	2,5895	1,9138	1,7759	1,3873
Šećerni alkoholi	Stahioza	0,9630	0,4389	0,4181	0,5798
	Manitol	1,9947	0,6874	0,2335	1,9934
	Erititrol	1,2824	1,3882	1,4511	1,2586
	Galaktitol	11,5465	12,9879	17,9204	11,3333
	Glicerol	0,2666	0,5003	0,3998	0,6454
	Sorbitol	38,3104	32,9259	11,6078	45,3643



Grafik 32. Relativna zastupljenost ugljenih hidrata kod vrsta *P. patens* (A), *E. hungaricus* (B) i *H. heimii* (C) u eksperimentu II. K<sub>0</sub> – nulta kontrolna grupa biljaka, ABA 0 - biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50μM ABA, 50 – biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50μM ABA i 50 mM NaCl, 250 - biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50μM ABA i 250 mM NaCl. Predstavljena su sva detektovana jedinjenja. Na osnovu intenziteta obojenosti prikazanoj na skali (0-max) tumači se zastupljenost određenog jedinjenja u tretmanu.

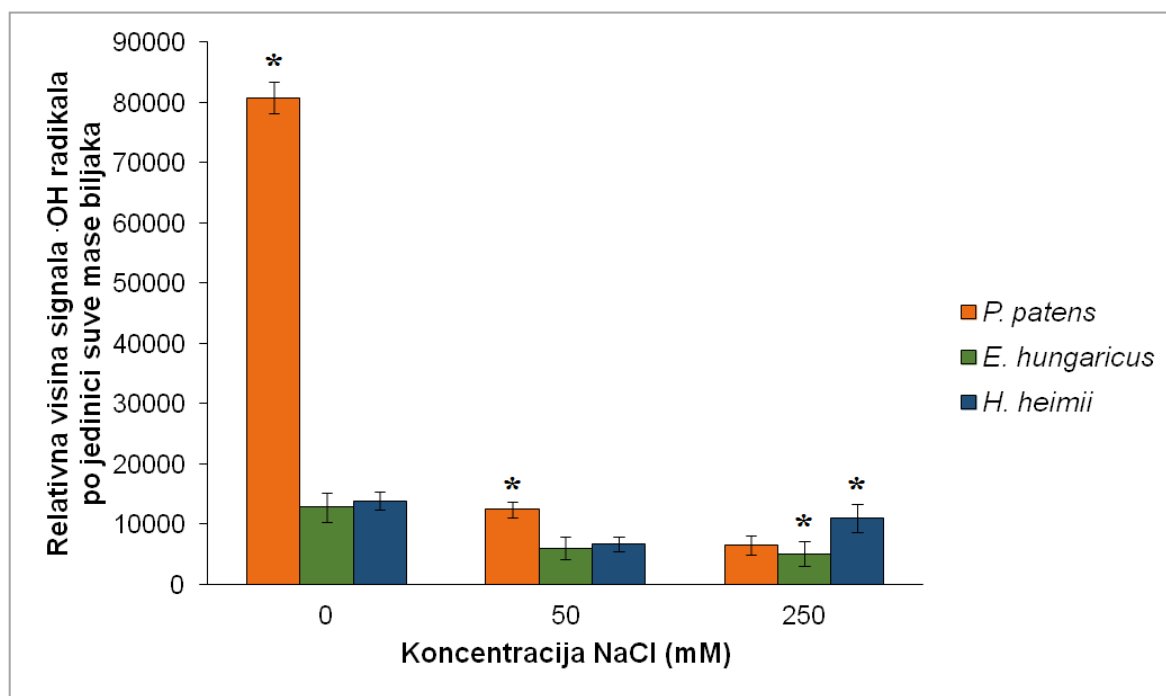
Kod sve tri ispitivane vrste mahovina dobijeni rezultati ukazuju da su šećeri veoma bitna komponenta čija se koncentracija menja usled delovanja NaCl i ABA, što ukazuje na povezanost sa reakcijom briofita sa stresom izazvanim solima. Pored toga, iako sve tri ispitivane vrste u najvećoj meri akumuliraju monosaharide i disaharide, evidentne su razlike u koncentraciji tih šećera, ali i u tipu drugih šećera koji se akumuliraju u većoj koncentraciji, kao što je izomaltoza kod *E. hungaricus* i *H. heimii*.

## 4.6. Detekcija reaktivnih oblika kiseonika

Spin trap metoda koja je korišćena na celim biljkama iz *in vitro* kulture nije bila pogodna za detektovanje reaktivnih oblika azota, prvenstveno radikala azot monoksida.

Sa druge strane, korišćenjem spin trap tehnike sa dodatkom DEPMPO, jedinjenja specifičnog za detekciju  $\cdot\text{O}_2^-$  i  $\cdot\text{OH}$ , dobijene su informacije o prisustvu i količini hidroksilnog radikala ( $\cdot\text{OH}$ ). Dodatno, mogao se detektovati i askorbil radikal ( $\text{Asc}^\cdot$ ) u određenim slučajevima. Signali se za jednu postavku mere dva puta, odnosno, prvi put se kao kontrola mere biljke bez dodatka spin trapa, prilikom čega se može detektovati tzv. centralni ili kontrolni signal poreklom od hidrokinaona, kao i askorbil radikal, dok se drugi put signali mere nakon dodatka DEPMPO, prilikom čega se mogu detektovati različiti oblici ROS.

Kod kontrolnih biljaka vrste *P. patens* u eksperimentu I, uočava se najveća visina signala porekom od  $\cdot\text{OH}$  radikala, što ukazuje na to da biljke u *in vitro* uslovima stvaraju  $\cdot\text{OH}$  radikale i da je ovakva visoka vrednost uobičajena za ovu vrstu u laboratorijskim uslovima (grafik 33). Pored navedenog, uočava se i prisustvo jakog signala za  $\text{Asc}^\cdot$  radikal u kontrolnoj grupi biljaka (slika 22 A). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, produkcija  $\cdot\text{OH}$  radikala drastično opada kod vrste *P. patens* u odnosu na kontrolu, dok se  $\text{Asc}^\cdot$  radikal detektuje u manjoj meri (slika 22 B). Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, izmerena je najniža visina signala DEPMPO/ $\cdot\text{OH}$  spin adukta, a navedene promene se jasno mogu uočiti na odgovarajućem spektru (slika 22 C). Moguć razlog za smanjenje količine detektovanih slobodnih radikala može biti povećana aktivnost antioksidativnih mehanizama, ali i smanjenje intenziteta fotosinteze.



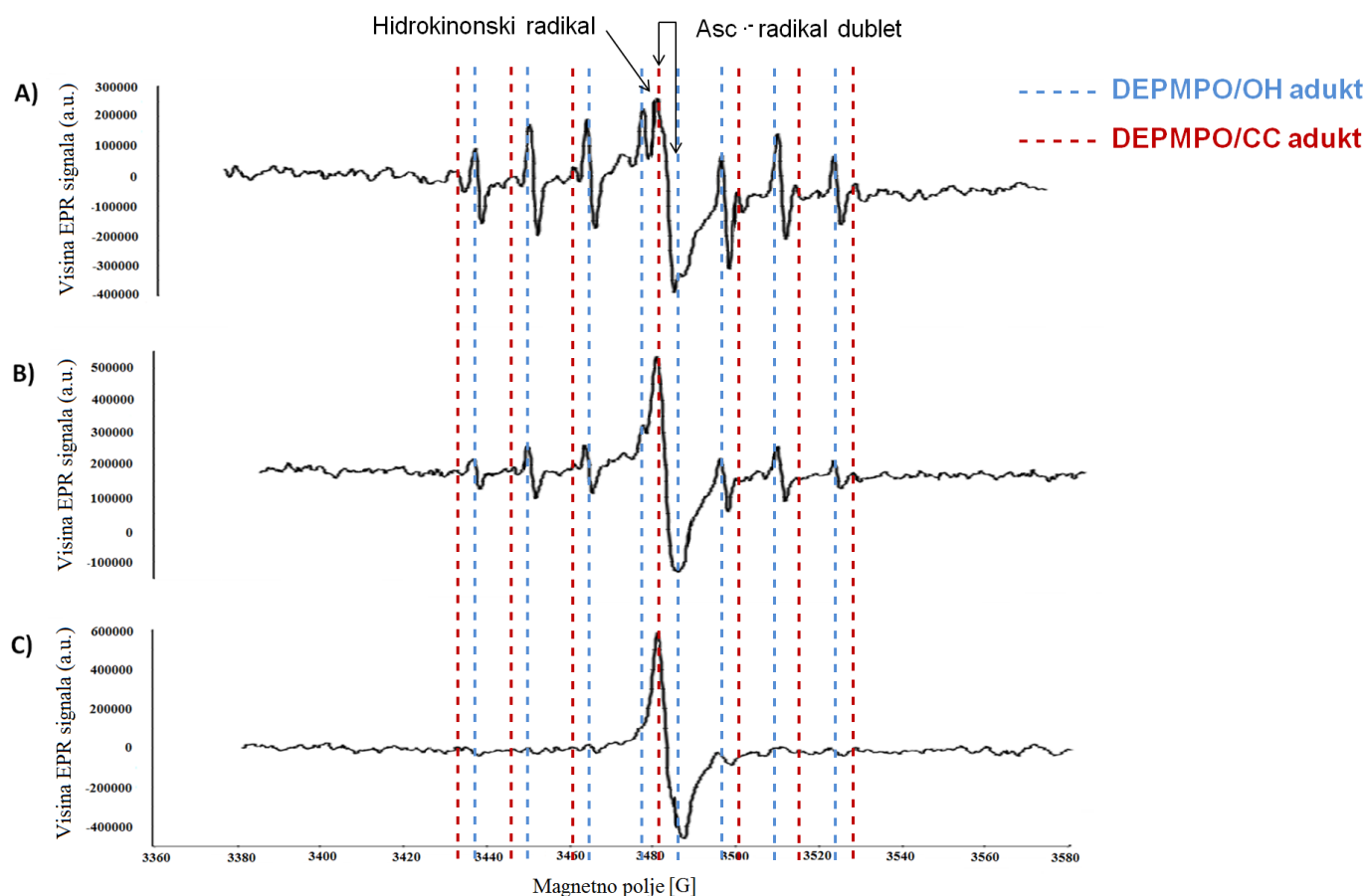
Grafik 33. Uticaj egzogeno dodatog NaCl na relativnu produkciju hidroksil radikala kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu I. Zvezdice na grafiku iznad barova označavaju prisustvo EPR signala askorbil radikala. Mereni su prvi signali od centralnog signala (levo i desno) za



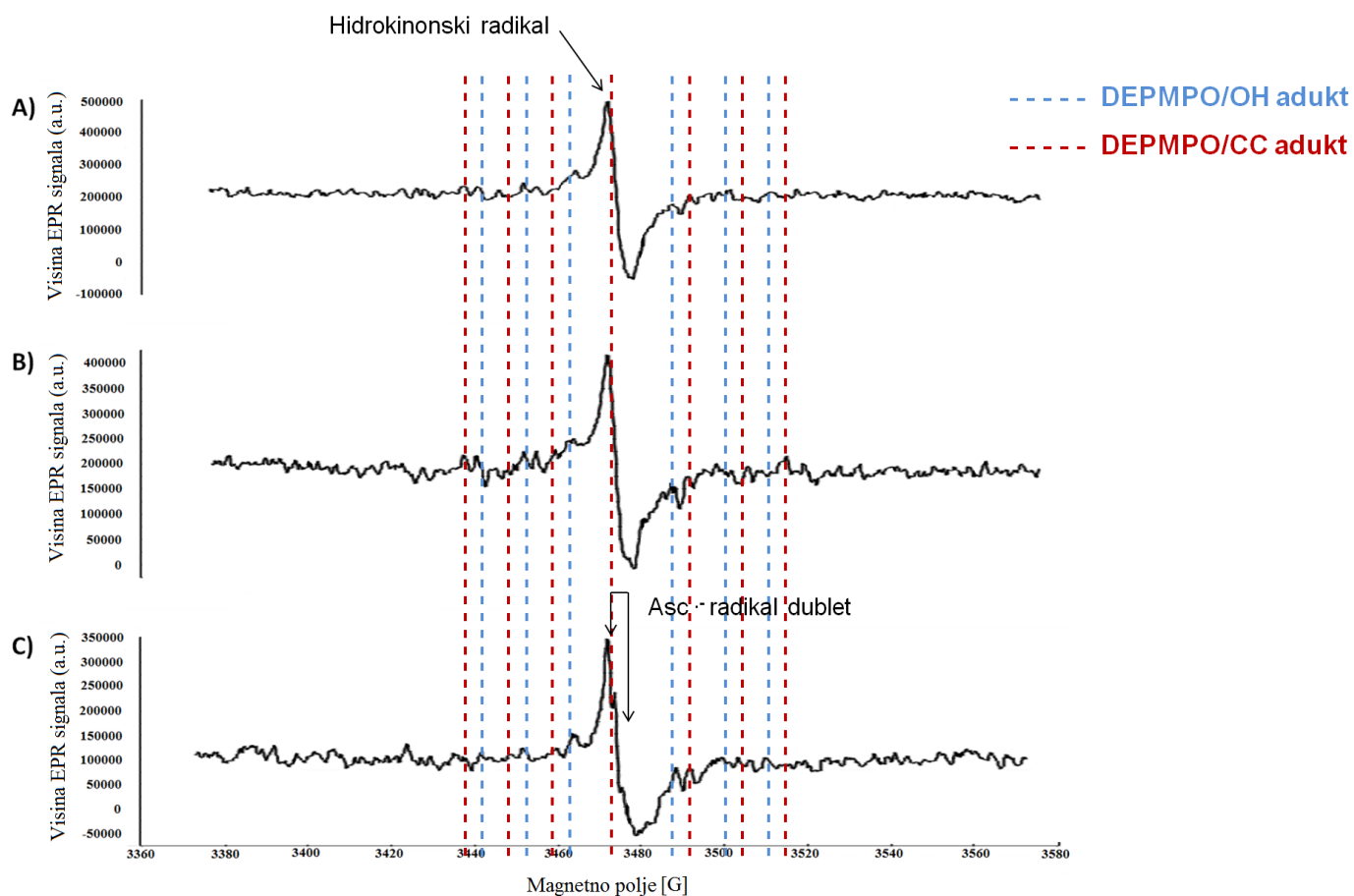
hidroksil radikal, a vrednost prikazana na grafiku je srednja vrednost visine tih signala. Greška je računata na osnovu visine šumova koji se uočavaju na krajevima spektra.

Kod brio-halofite *E. hungaricus* se ne zapaža drastična razlika u količini produkovanih  $\cdot\text{OH}$  radikala kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl u odnosu na kontrolnu grupu biljaka u eksperimentu I (grafik 33). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl se zapaža neznatno smanjenje količine detektovanih  $\cdot\text{OH}$  radikala, dok  $\text{Asc}^{\cdot-}$  radikali nisu detektovani (slika 23 B). Pored toga, kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl količina detektovanih  $\cdot\text{OH}$  radikala je približnih vrednosti kao i kod kontrolne grupe biljaka. Međutim, kod ovih biljaka verovatno je i prisustvo  $\text{Asc}^{\cdot-}$  radikala (slika 23 C).

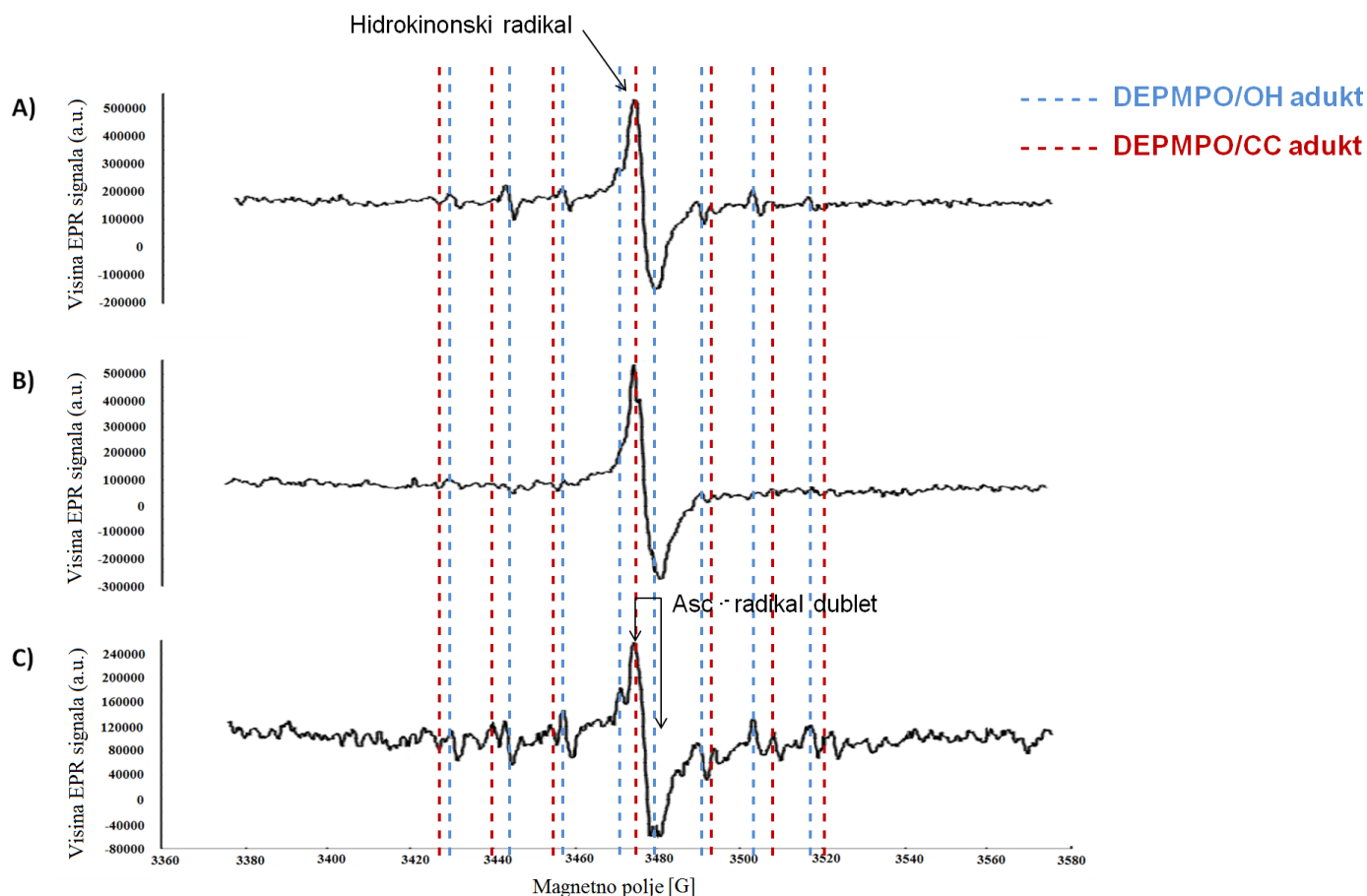
U kontrolnoj grupi biljaka vrste *H. heimii* uočava se smanjena proizvodnja  $\cdot\text{OH}$  radikala, slično kao i kod vrste *E. hungaricus* (grafik 33). Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, vrednost detektovanih  $\cdot\text{OH}$  radikala se smanjuje, dok  $\text{Asc}^{\cdot-}$  radikali nisu detektovani (slika 24 B). Sa druge strane, kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, uočava se porast količine produkovanih  $\cdot\text{OH}$  radikala, ugljenično centriranih radikala, kao i prisustvo  $\text{Asc}^{\cdot-}$  radikala (slika 24 C).



Slika 22. Prikaz EPR signala za hidroksil i askorbil radikala kod *P. patens* u eksperimentu I. A) signal iz kontrolne grupe biljka; B) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl i C) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl.



Slika 23. Prikaz EPR signala za hidrosil i askorbil radikala kod *E. hungaricus* u eksperimentu I A) signal iz kontrolne grupe biljka; B) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl i C) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl.

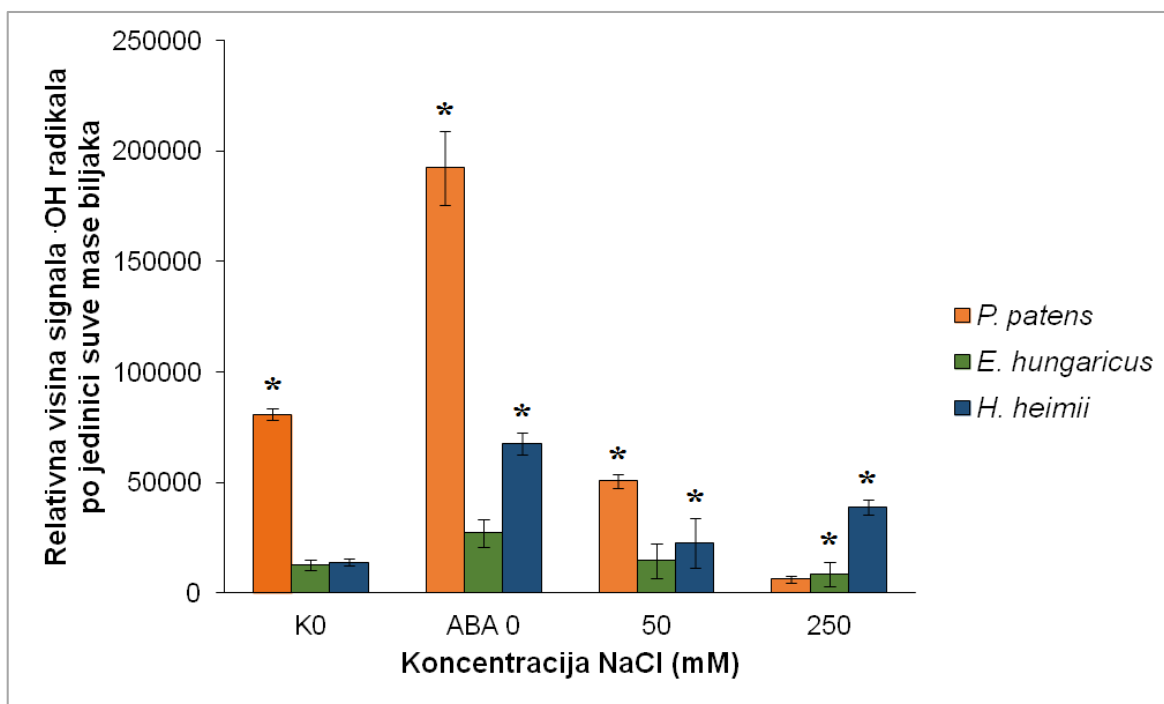


Slika 24. Prikaz EPR signala za hidroksil i askorbil radikala kod *H. heimii* u eksperimentu I. A) signal iz kontrolne grupe biljaka; B) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl i C) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl.

Brio-halofitne vrste *E. hungaricus* i *H. heimii* ne proizvode veliku količinu  $\cdot\text{OH}$  radikala u kontrolnim postavkama u poređenju sa nehalofitom mahovinom *P. patens*, kao što se može uočiti na osnovu grafika 29 i 30, respektivno. Pretpostavka je da se kod njih količina slobodnih radikala održava na manjem nivou, a u vezi je sa njihovom strategijom tolerancije stresa izazvanog solima.

Sa druge strane, u eksperimentu II se zapažaju drugačiji rezultati. Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA, uočavaju se višestruko veće vrednosti  $\cdot\text{OH}$  radikala nego u eksperimentu I, kao i u odnosu na kontrolne grupe biljaka za sve tri ispitivane vrste mahovina (grafik 30).

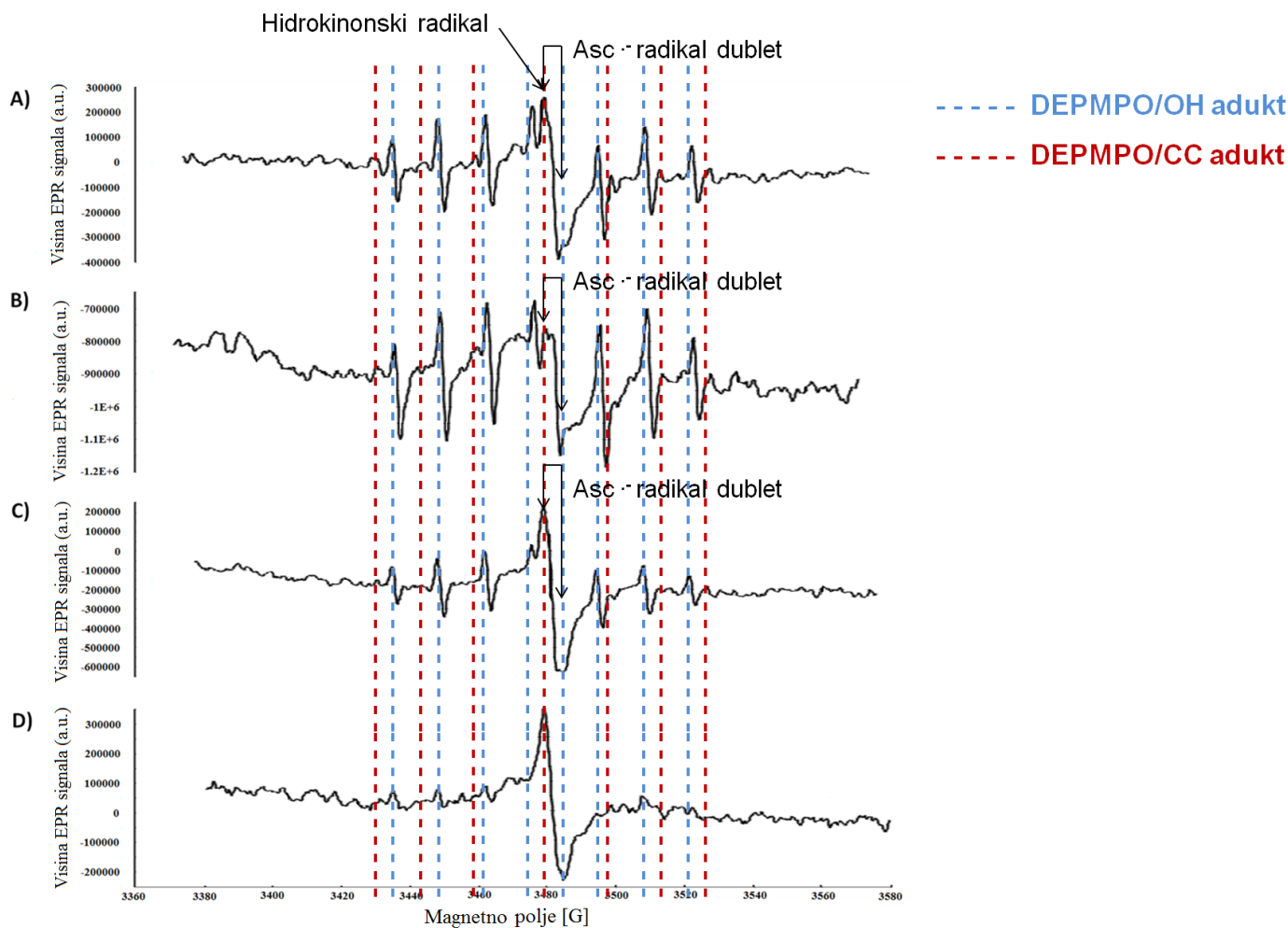
Egzogeno dodata ABA dovodi do povećanja količine  $\cdot\text{OH}$  radikala kod vrste *P. patens* u odnosu na kontrolnu grupu biljaka (grafik 4, slika 25 A i 25 B). I kod ovih biljaka je moguće detektovati  $\text{Asc}^{\cdot-}$  radikal (slika 25 B). Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA, dolazi do smanjenja ukupnih detektovanih  $\cdot\text{OH}$  radikala u odnosu na kontrolne grupe biljaka (K0 i ABA0), dok je i dalje prisutan  $\text{Asc}^{\cdot-}$  radikal (slika 25 C). Veoma niske vrednosti  $\cdot\text{OH}$  radikala se detektuju kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, a nakon predtretmana ABA, a detekcija  $\text{Asc}^{\cdot-}$  radikala nije bila moguća (slika 25 D). Pretpostavka je da ABA deluje kao stimulans za produkciju  $\cdot\text{OH}$  kod *P. patens*, koji dalje deluju kao signalni molekuli u stresu izazvanom NaCl. Pored  $\cdot\text{OH}$  radikala, intenzivno je prisustvo  $\text{Asc}^{\cdot-}$  radikala kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA, kao i hidrokinonskog radikala.



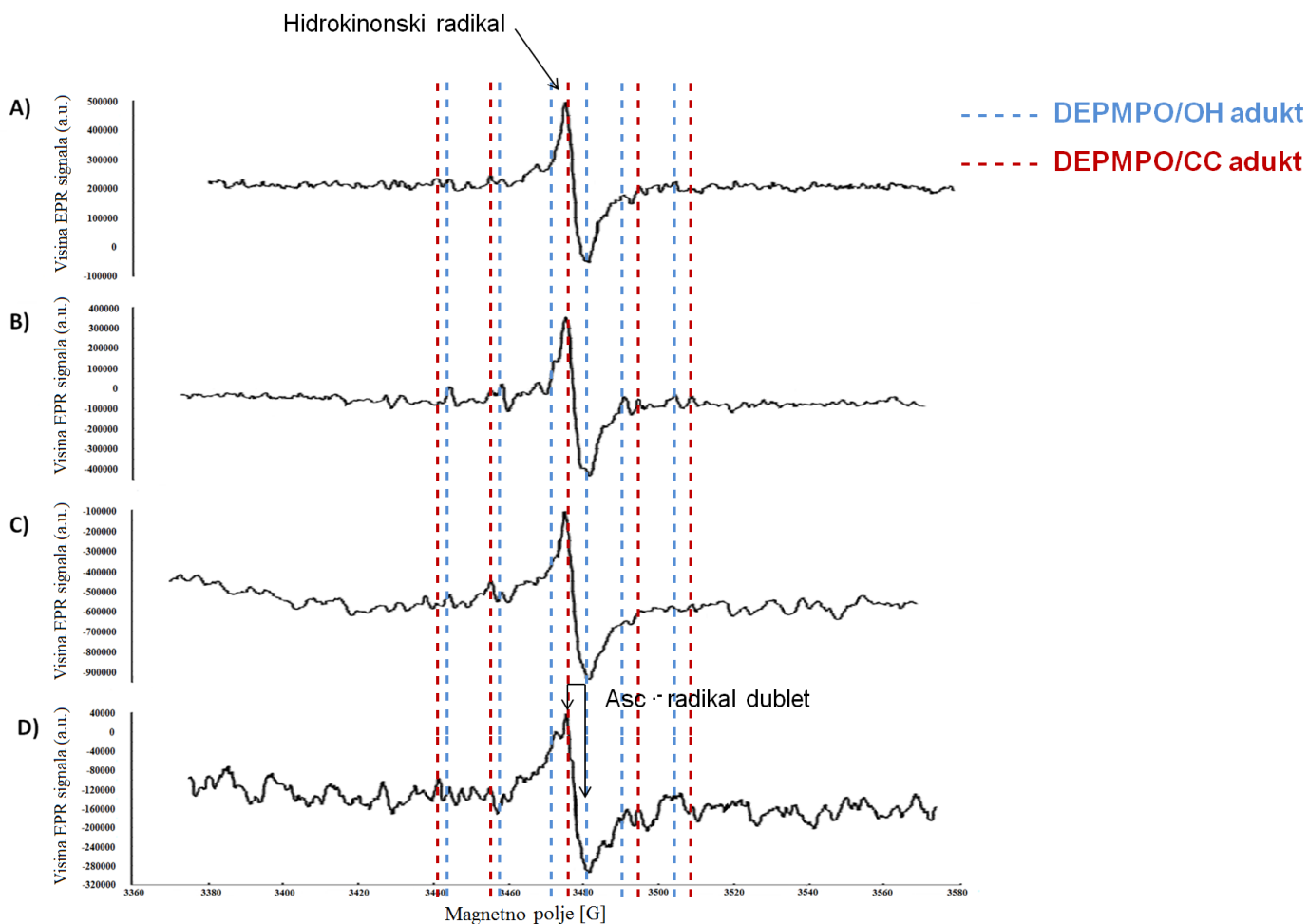
Grafik 34. Uticaj egzogeno dodate ABA i NaCl na relativnu produkciju hidroksil radikala kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* u eksperimentu II. Zvezdice na grafiku iznad barova označavaju prisustvo EPR signala askorbil radikala. Mereni su prvi signali od centralnog signala (levo i desno) za hidroksil radikal, a vrednost prikazana na grafiku je srednja vrednost visine tih signala. Greška je računata na osnovu visine šumova koji se uočavaju na krajevima spektra.

Kod vrste *E. hungaricus*, produkcija  $\cdot\text{OH}$  radikala je relativno stabilna u svim tretmanima (grafik 30), odnosno, vrednosti  $\cdot\text{OH}$  radikala ne variraju značajno usled delovanja ABA i NaCl. Količina generisanih  $\cdot\text{OH}$  radikala identifikovanih u eksperimentu II četvorostruko je veća nego u eksperimentu I, što ukazuje na to da egzogeno primenjena ABA dovodi do povećanja produkcije  $\cdot\text{OH}$  radikala. Ne zapaža se prisustvo Asc $\cdot$  radikala u kontrolnih grupama biljaka (slika 26 A i B), ali ni kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA (slika 26 C). U odnosu na kontrolne grupe biljaka, kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl, bilo 50 mM, bilo 250 mM, nakon predtretmana ABA, uočava se smanjenje količine  $\cdot\text{OH}$  radikala. Međutim, kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA uočava se prisustvo Asc $\cdot$  radikala u manjoj meri (Slika 26 D), iako se ukupna količina detektovanih slobodnih radikala smanjuje.

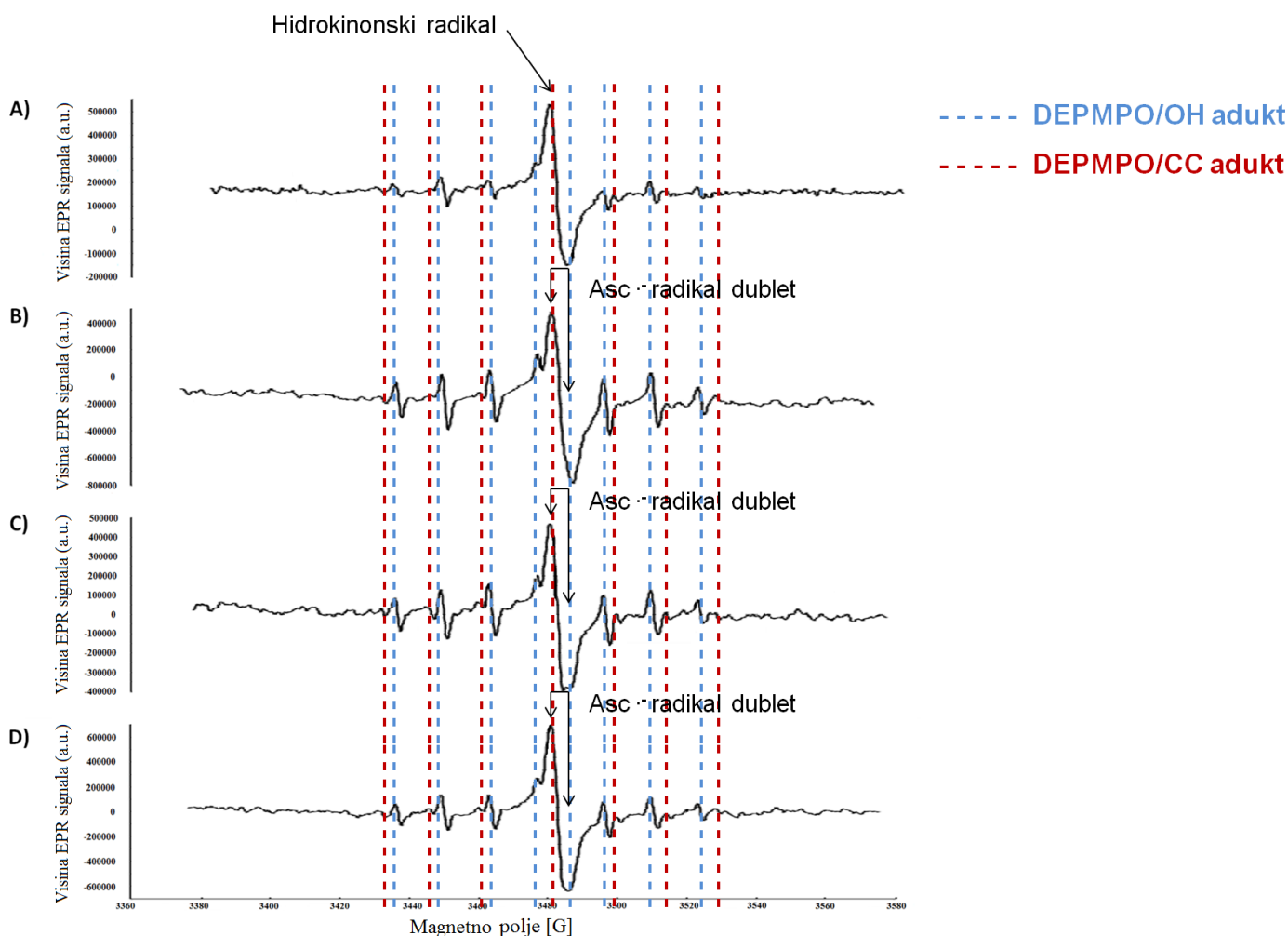
Kod *H. heimii* se zapažaju slične promene opisane za vrstu *E. hungaricus*. Egzogeno dodata ABA dovodi do povećanja  $\cdot\text{OH}$  radikala kod biljaka, a moguće je detektovati prisustvo Asc $\cdot$  radikala (slika 27 B). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA, količina detektovanih  $\cdot\text{OH}$  radikala se smanjuje, ali je moguće uočiti prisustvo Asc $\cdot$  radikala (slika 27 C). Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA, zapaža se povećanje produkcije  $\cdot\text{OH}$  radikala i uočava prisustvo Asc $\cdot$  radikala (slika 27 D).



Slika 25. Prikaz EPR signala za hidroksil i askorbil radikala kod *P. patens* u eksperimentu II. A) signal iz kontrolne grupe biljka (K<sub>0</sub>); B) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 μM ABA (ABA 0); C) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 μM ABA i 50 mM NaCl i D) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 μM ABA i 250 mM NaCl.



Slika 26. Prikaz EPR signala za hidroksil i askorbil radikala kod *E. hungaricus* u eksperimentu II. A) signal iz kontrolne grupe biljka ( $K_0$ ); B) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom  $50\mu\text{M}$  ABA (ABA 0); C) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom  $50\mu\text{M}$  ABA i  $50\text{ mM}$  NaCl i D) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom  $50\mu\text{M}$  ABA i  $250\text{ mM}$  NaCl.



Slika 27. Prikaz EPR signala za hidroksil i askorbil radikala kod *H. heimii* u eksperimentu II. A) signal iz kontrolne grupe biljka ( $K_0$ ); B) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom  $50\mu\text{M}$  ABA (ABA 0); C) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom  $50\mu\text{M}$  ABA i  $50\text{ mM}$  NaCl i D) signal biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom  $50\mu\text{M}$  ABA i  $250\text{ mM}$  NaCl.

## 4.7. Histochemijska analiza odabranih grupa jedinjenja

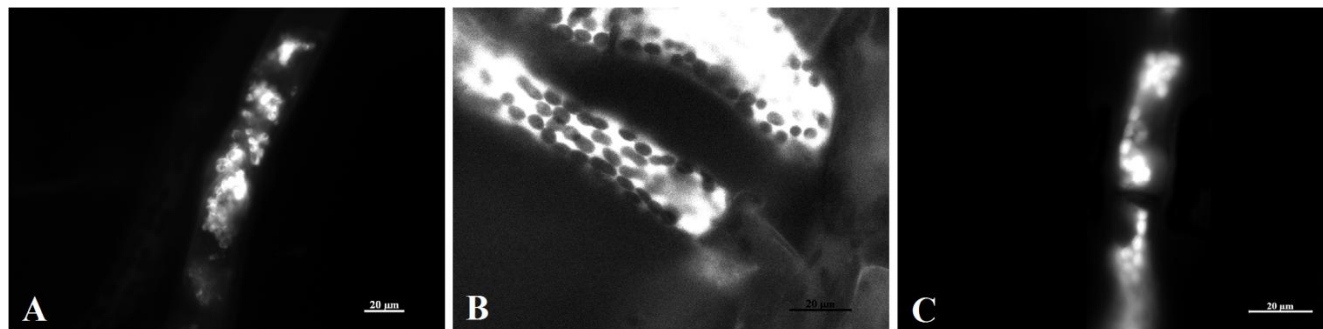
### 4.7.1. Određivanje fenolnih jedinjenja UV – autofluorencijom

UV autofluorencija se koristi za identifikaciju jedinjenja koja fluoresciraju. U ovoj disertaciji su ovom tehnikom identifikovana fenolna jedinjenja.

Na slici 28 su prikazani rezultati UV – autofluorencije kod vrste *P. patens* nakon eksperimenta I. U kontrolnoj grupi biljaka uočava se fluorescencija u protonemi, posebno u kaulonemi. Ne fluoresciraju hloroplasti, već zrnast sadržaj, koji je moguće poreklom od agregata ili specifičnih vezikula u kojima se skladište fenoli (Slika 28 A). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom  $50\text{ mM}$  NaCl uočava se slabija fluorescencija u citoplazmi hloroneme, poreklom od prisutnih fenolnih jedinjenja. Filoidi i hloroplasti kod ovih biljaka takođe ne fluoresciraju, što ukazuje da se fenolna jedinjenja verovatno ne nakupljaju u tim delovima biljke (Slika 28 B). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom  $250\text{ mM}$  NaCl, na mikroskopu se uočava veoma slaba fluorescencija delimično citoplazmatskog sadržaja, delimično hloroplasta (Slika 28 C). Međutim, zbog slabe

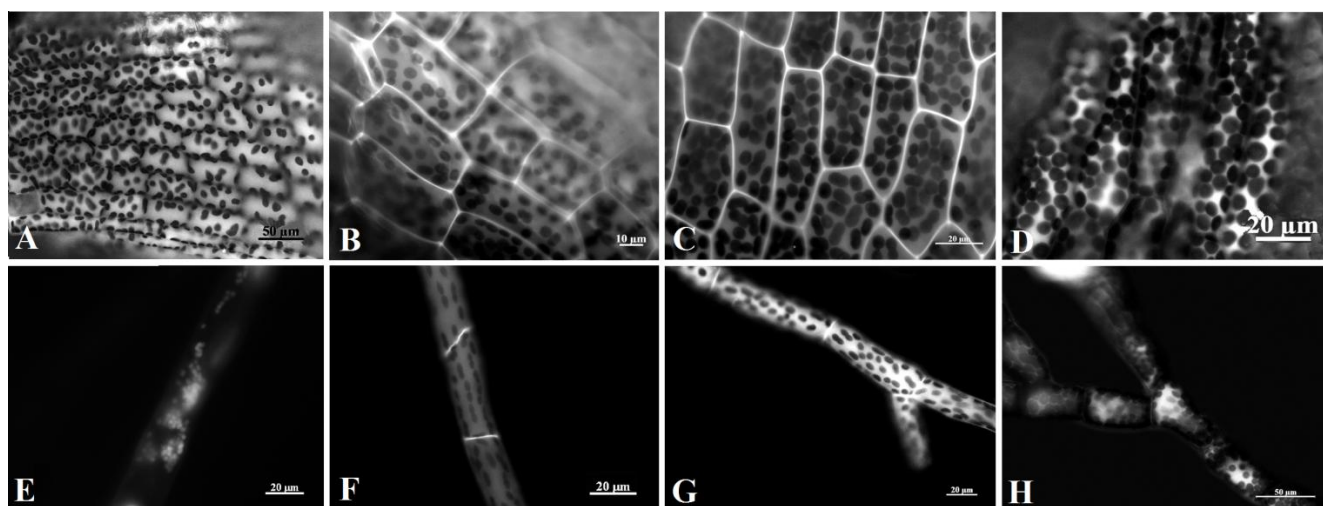


fluorescencije može se pretpostaviti da je prisutna veoma mala količina fenolnih jedinjenja u protonemi *P. patens*.



Slika 28. Histoheмиjska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem UV - autofluorescencije kod vrste *P. patens* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) - protonema; B) 50 mM NaCl - protonema; C) 250 mM NaCl – protonema

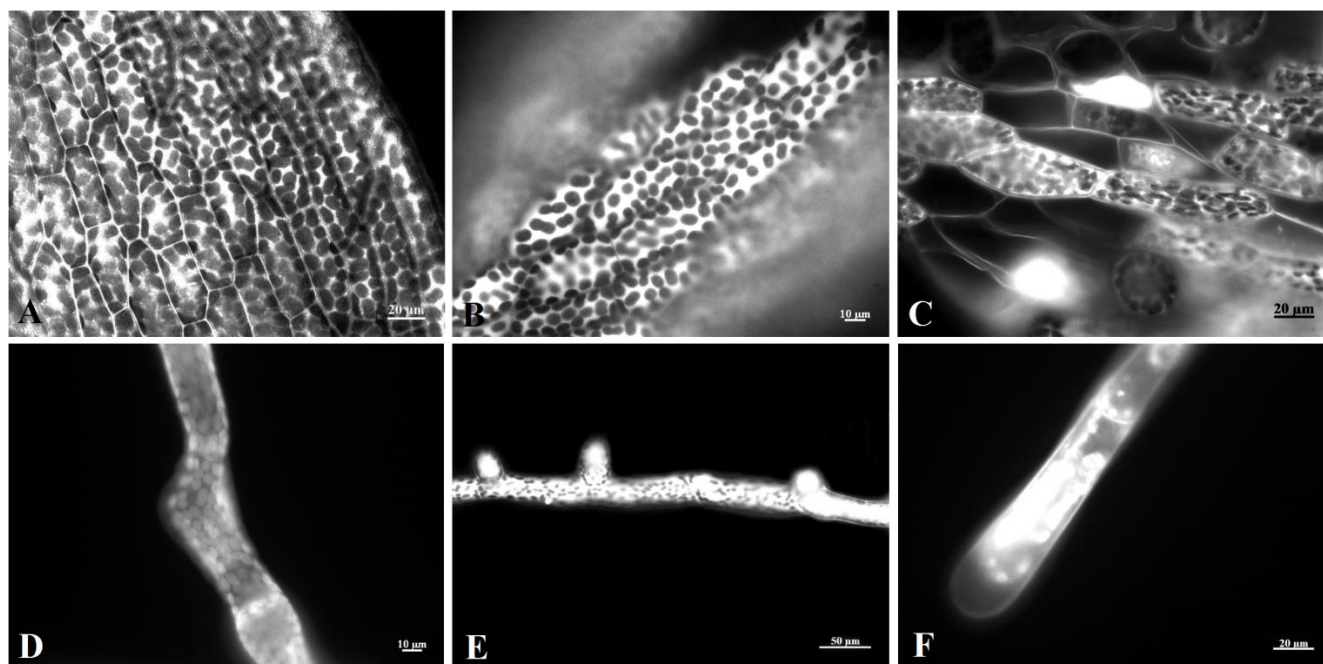
Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA uočava se fluorescencija u ćelijskim zidovima filoida (slika 29 B i F), što je znatno drugačije u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka. Ovakav rezultat može da ukazuje da ABA utiče na sintezu fenola ćelijskog zida ili na njihovu akumulaciju u ovom delu ćelije. Generalno se i u protonemama vrste *P. patens* u eksperimentu II zapaža slabija fluorescencija u citoplazmi, dok je dominantna fluorescencija u ćelijskim zidovima (slika 29 F). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, a nakon predtretmana ABA, uočava se intenzivna fluorescencija u citoplazmi protoneme ukazujući na povećanu akumulaciju fenola u unutrašnjosti ćelije (slika 29 G). Filoidi ovih biljaka izgledaju slično kao i kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA (slika 29 C).



Slika 29. Histoheмиjska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem UV - autofluorescencije kod vrste *P. patens* u eksperimentu II. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – filoid; E) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F) ABA kontrola – protonema; G) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – protonema; H) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – protonema

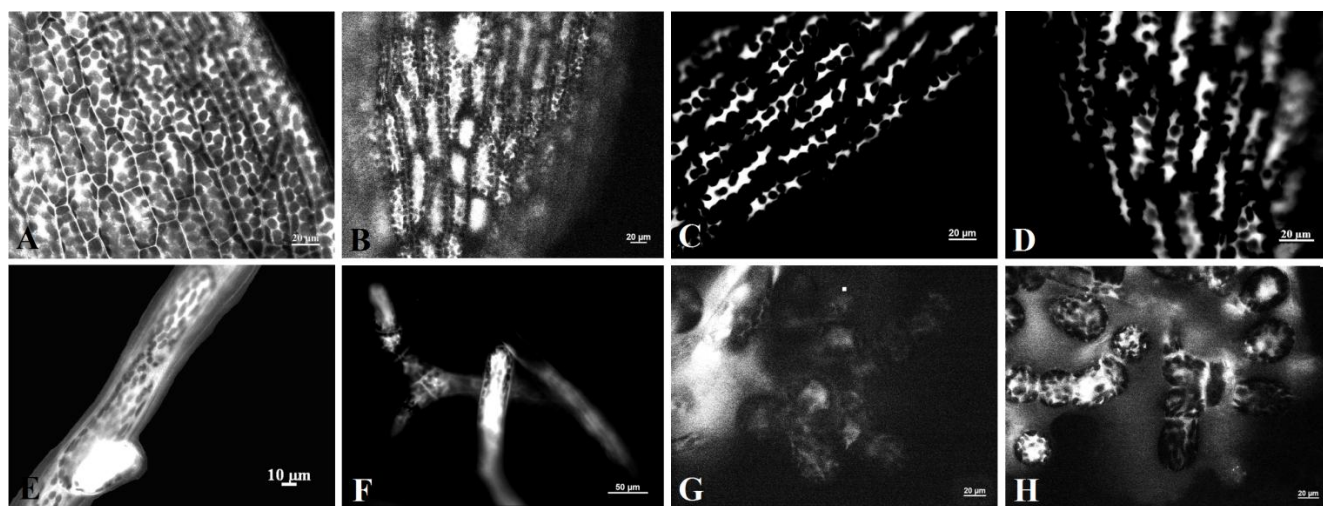
Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM fluorescencija je nešto slabija u citoplazmi ćelija filoida, kao i citoplazmi protoneme ukazujući na smanjenje koncentracije fenolnih jedinjenja (Slika 29 D i H). Ne uočava se fluorescencija ćelijskih zidova, pa se pretpostavlja da se fenoli ne akumuliraju u značajnoj meri u ovom delu ćelije.

Filoidi i protonema vrste *E. hungaricus*, za razliku od *P. patens*, pokazuje nešto jaču fluorescenciju pod mikroskopom u eksperimentu I, što potencijalno ukazuje na veću količinu fenolnih jedinjenja (slika 30). Kod kontrolne grupe biljaka se detektuje fluorescencija u citoplazmi ćelija filoida, kao i u citoplazmi hloroneme (Slika 30 A i D). Kauloneme slabije fluoresciraju, pa se pretpostavlja manja količina fenolnih jedinjenja. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl uočava se veoma jaka fluorescencija u protonemi, a ponegde i u ćelijskim zidovima ćelija protoneme, što ukazuje na veću količinu fenolnih jedinjenja koje se akumulira u navedenim delovima (Slika 30 B i E). Ćelije filoida fluoresciraju na sličan način kao i kod kontrolnih biljaka. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl uočava se veoma jaka fluorescencija kako u ćelijama filoida, tako u ćelijama protoneme. Pored fluorescencije citoplazme, zapaža se jaka fluorescencija ćelijskih zidova, što ukazuje na prisustvo povećane koncentracije fenolnih jedinjenja (Slika 30 C i F).



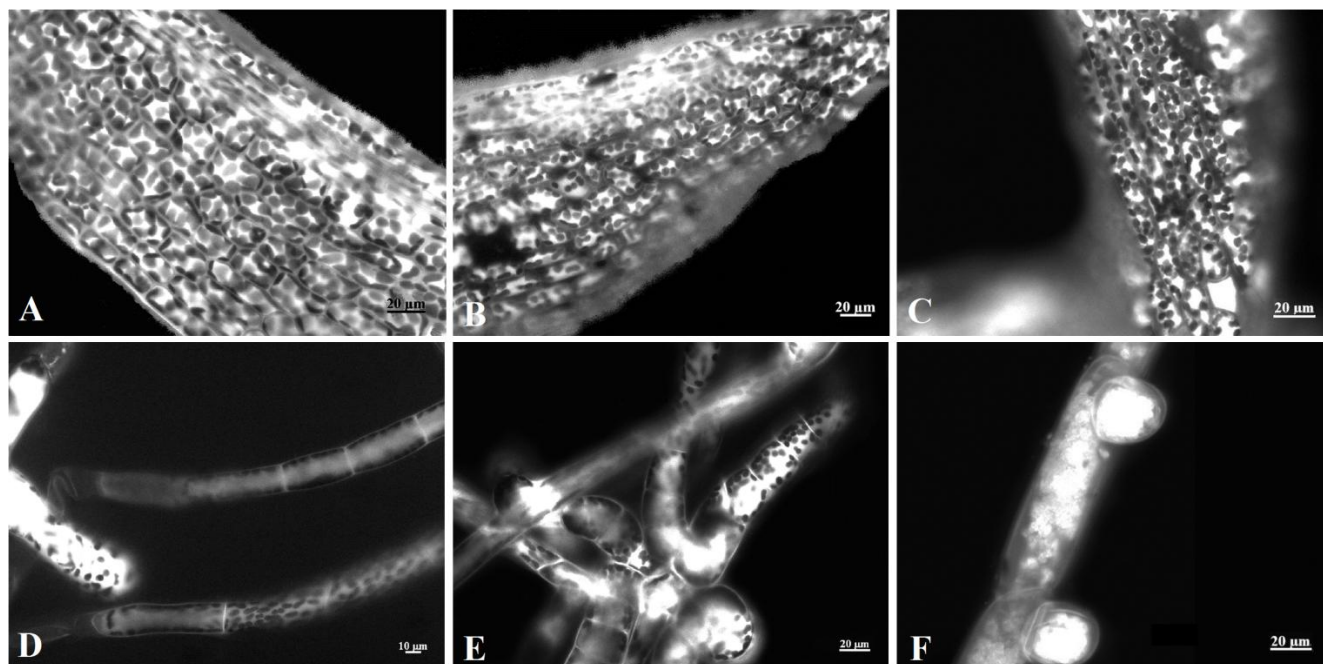
Slika 30. Histoheimska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem UV - autofluorescencije kod vrste *E. hungaricus* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E) 50 mM NaCl – protonema; F) 250 mM NaCl – protonema

Rezultati dobijeni u eksperimentu II za vrstu *E. hungaricus* (Slika 31) su slični rezultatima dobijenim u eksperimentu I (Slika 30). Egzogeni ABA utiče na akumulaciju fenolnih jedinjenja u citoplazmi filoida i u citoplazmi i ćelijskim zidovima protoneme (slika 31 B i F). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl uočava se fluorescencija u citoplazmi filoida (slika 31 C i D), ali i u citoplazmi protoneme. Kod biljaka koje formiraju brahicite, a gajene su na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50  $\mu$ M ABA i 250 mM NaCl, fluorescira sadržaj brahicita i ćelijski zid (slika 31 H), što ukazuje na akumulaciju fenola u ovim strukturama.



Slika 31. Histoemijska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem UV - autofluorescencije kod vrste *E. hungaricus* u eksperimentu II. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – filoid; E) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F) ABA kontrola – protonema; G) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – protonema; H) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl - protonema

U kontrolnoj grupi biljaka vrste *H. heimii* se uočava jaka fluorescencija u citoplazmi ćelija filoida i protoneme (Slika 32 A i D). Pored sadržaja protoneme, fluoresciraju u manjoj meri i ćelijski zidovi. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl uočava se jaka fluorescencija u citoplazmi filoida i protoneme, a posebno u ćelijskim zidovima kauloneme (Slika 32 B i E). Jaka fluorescencija ukazuje na prisustvo velike količine fenolnih jedinjenja kod ove vrste.

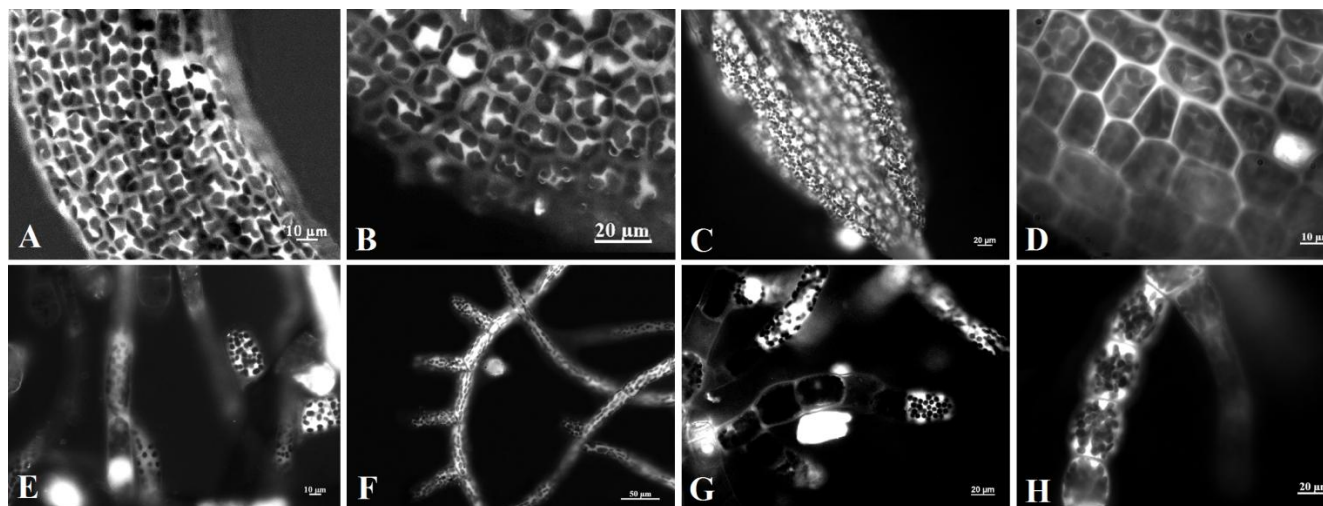


Slika 32. Histoemijska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem UV - autofluorescencije kod vrste *H. heimii* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E) 50 mM NaCl – protonema; F) 250 mM NaCl – protonema



Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl fluorescencija je uočljiva u citoplazmi filoida (slika 32 C). Pored toga, sadržaju kauloneme veoma intenzivno fluorescira (slika 32 F).

Kod biljaka vrste *H. heimii* gajenih na podlozi sa dodatkom ABA uočava se jaka fluorescencija u citoplazmi ćelija filoida i protoneme (slika 33 B i F). Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA, fluorescencija se čini intenzivnija sugerišući na veću količinu fenolnih jedinjenja (slika 33 C i G). Za razliku od njih, kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA, fluorescencija je intenzivnija u ćelijskim zidovima ćelija filoida (slika 33 D).



Slika 33. Histoheimijska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem UV - autofluorescencije kod vrste *H. heimii* u eksperimentu II. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – filoid; E) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F) ABA kontrola – protonema; G) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – protonema; H) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl - protonema

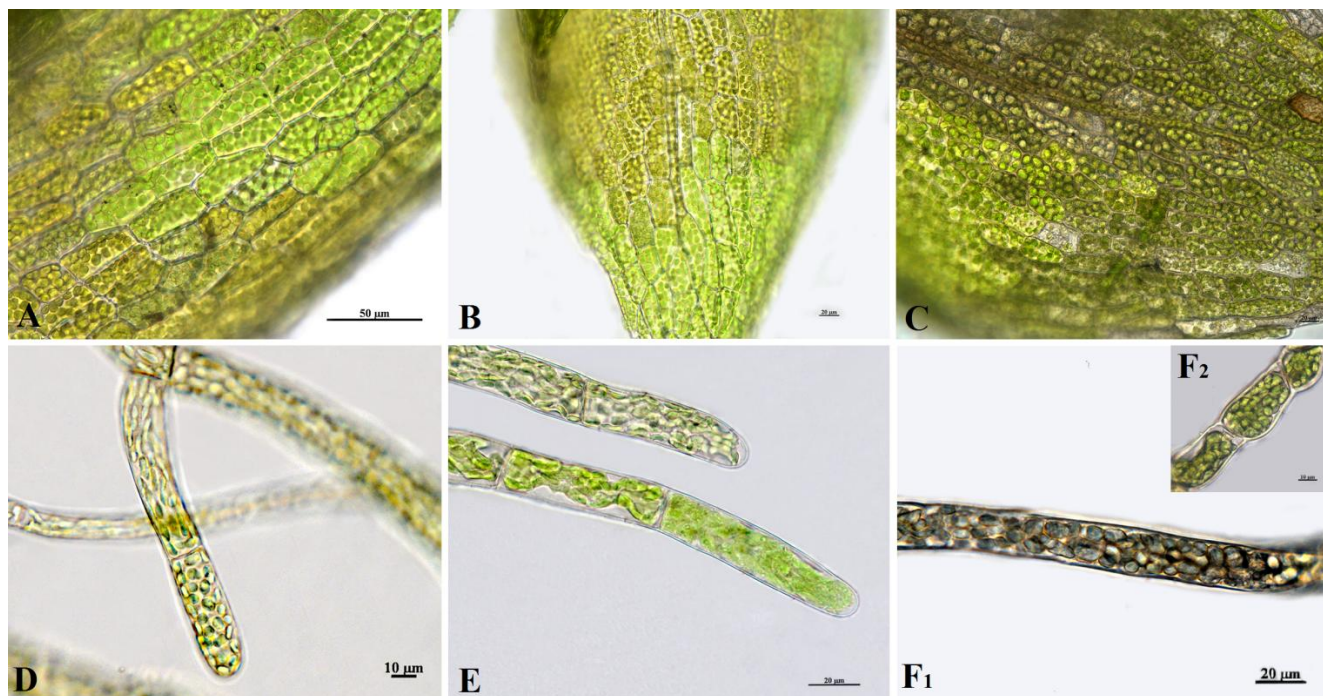
Rezultati dobijeni UV – autofluorescencijom nesumnjivo potvrđuju prisustvo fenolnih jedinjenja kod sve tri ispitivane vrste i u korelaciji su sa ostalim rezultatima dobijenim analizom fenola u ovoj disertaciji.

#### 4.7.2. Određivanje fenolnih jedinjenja reakcijom sa $FeCl_3$

Bojena reakcija sa  $FeCl_3$  je tehnika koja se koristi da ukaže na prisustvo i lokalizaciju fenolnih jedinjenja. Rezultati dobijeni ovom metodom su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim UV – autofluorescencijom.

Kod kontrolne grupe biljaka vrste *P. patens* uočava se veoma slabo, maslinasto-zeleno obojenje u citoplazmi ćelija filoida i protoneme (slika 34 A i D). Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, uočava se slična reakcija sa  $FeCl_3$  kao i u kontrolnoj grupi, osim što je potrebno naglasiti da u ovim uslovima ćelije protoneme plazmoliziraju, pa je teško snimiti turgescentnu ćeliju (slika 34 B i E). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl uočava se intenzivna bojena reakcija, kako u citoplazmi ćelija filoida, tako i u protonemi. Postoji razlika u reakciji između kauloneme i hloroneme. U kaulonemalnim ćelijama se boji zrnast sadržaj i boja je intenzivno

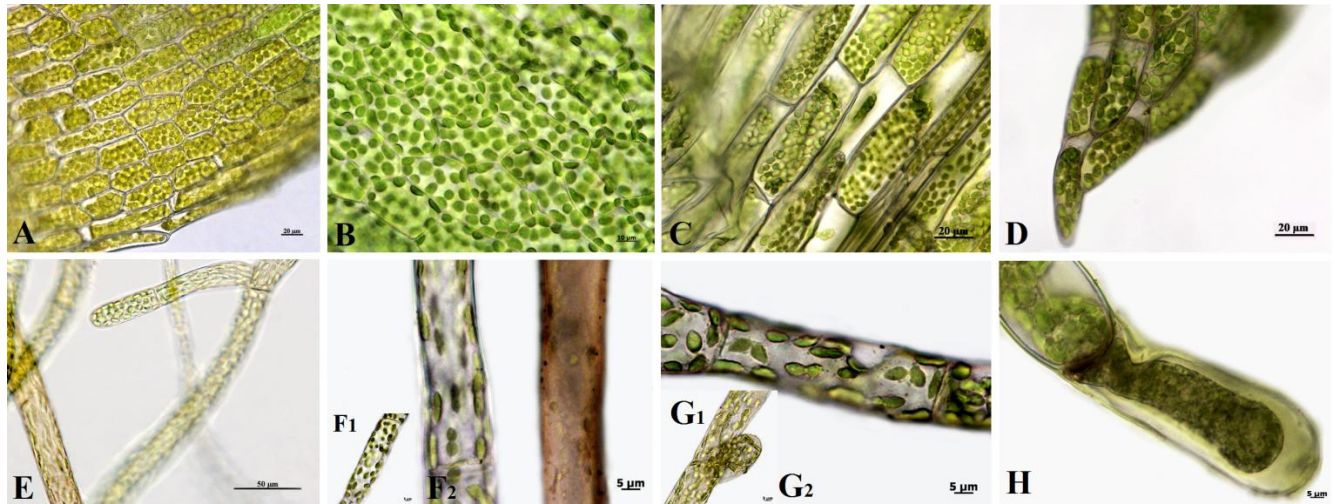
siva (slika 34 F1), dok se u hloronemalnim ćelijama citoplazma boji maslinasto-zeleno (slika 34 F2). Opisani rezultati ukazuju na postojanje fenolnih jedinjenja kod *P. patens*, koja se pretežno akumuliraju u citoplazmi ćelija.



Slika 34. Histohemijska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem  $\text{FeCl}_3$  kod vrste *P. patens* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E) 50 mM NaCl – protonema; F1 i F2) 250 mM NaCl – protonema

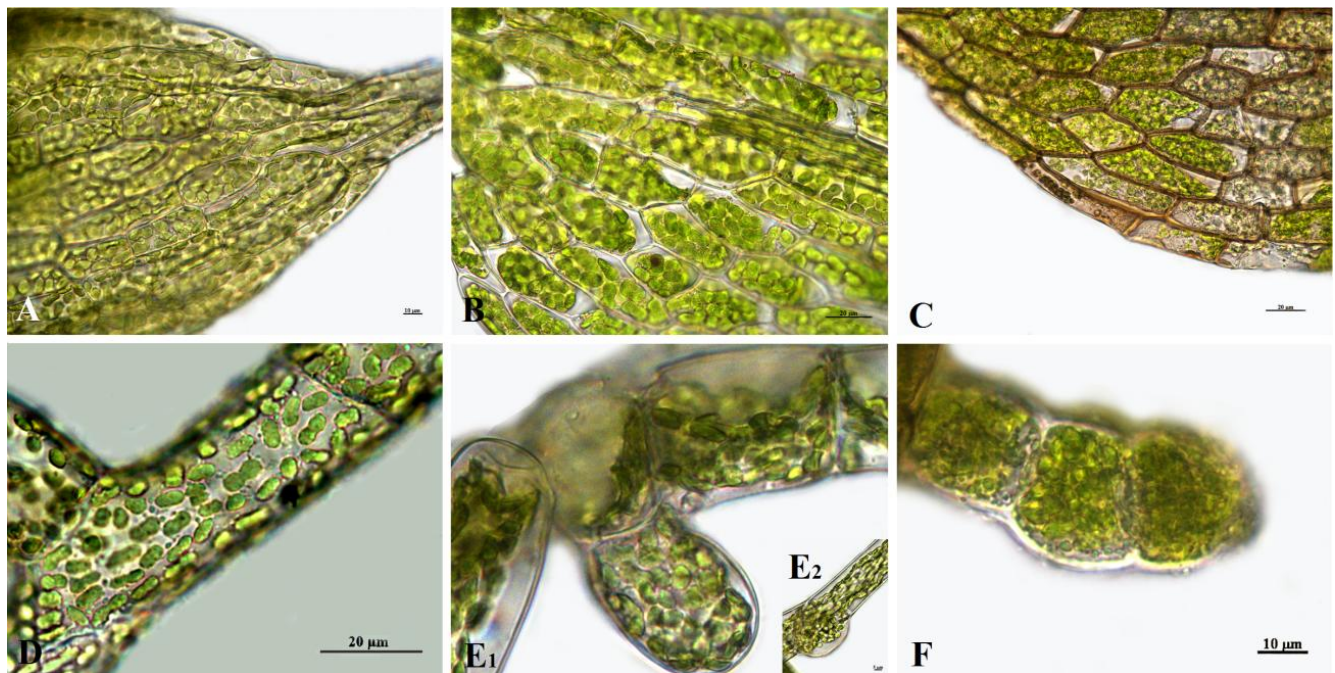
Kada se biljke vrste *P. patens* gaje na podlozi sa dodatkom ABA, intenzitet obojenosti ćelijskih struktura je dosta slabiji (slika 35 B i E), što ukazuje da se fenoli ne akumuliraju u citoplazmi ćelija, kao u kontrolnoj grupi biljaka. Braonkasto obojenje u ćelijskim zidovima filoida govori o depoziciji fenola u ćelijske zidove, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim UV – autofluorescencijom. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA intenzivnija je reakcija ćelijskih zidova ćelija filoida, ali i protoneme (slika 35 C i G), što ukazuje na značajnu akumulaciju fenolnih jedinjenja. Kod biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA zapažaju se slične promene u filoidu i protonemi. Posebno se intenzivno boje vršne ćelije protoneme (slika 35 H).





Slika 35. Histohemijska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem  $\text{FeCl}_3$  kod vrste *P. patens* u eksperimentu II. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 250 mM NaCl – filoid; E) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F1 i F2) ABA kontrola – protonema; G1 i G2) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 50 mM NaCl – protonema; H) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 250 mM NaCl - protonema

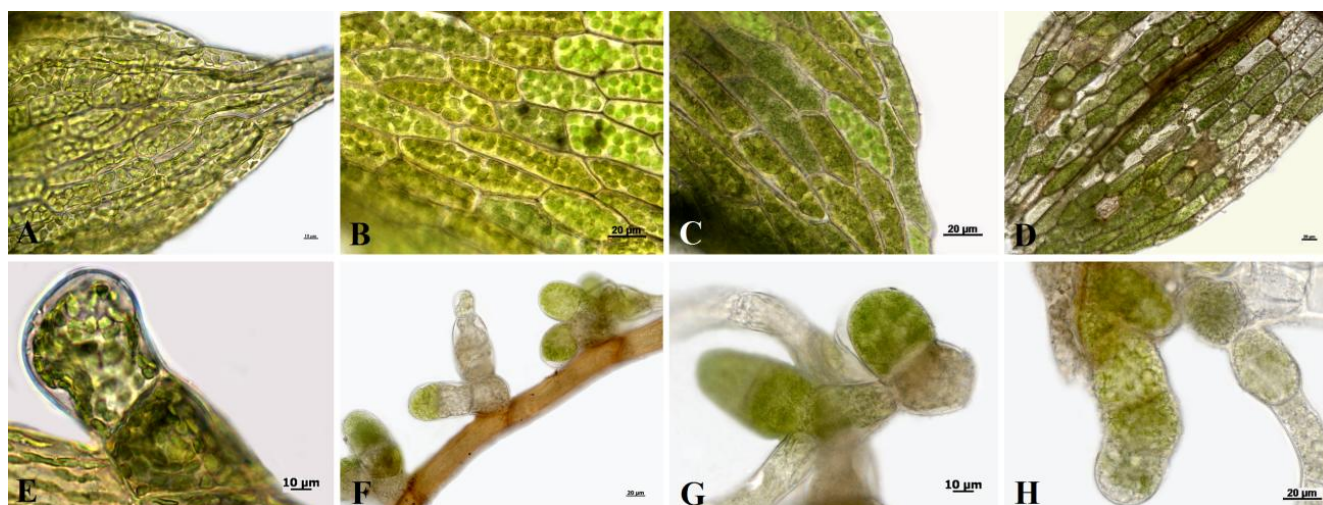
Kod kontrolne grupe biljaka vrste *E. hungaricus* zapaža se intenzivna obojesnost sadržaja ćelija filoida što je uočljivo u vidu maslinasto zelene do braon boje, kao i obojenost hloroneme, gde se uočava obojenost citoplazme i hloroplasta. Pored ovih struktura zapažaju se i sitne sferične strukture koje se boje tamno zeleno (slika 36 D). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM



Slika 36. Histohemijska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem  $\text{FeCl}_3$  kod vrste *E. hungaricus* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E1 i E2) 50 mM NaCl – protonema; F) 250 mM NaCl – protonema

NaCl zapažaju se bojene reakcije u citoplazmi ćelija filoida i protoneme. Intenzivnija reakcija se uočava kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl. Naime, fenolna jedinjenja se akumuliraju u citoplazmi i ćelijskim zidovima ćelija filoida, na šta ukazuje intenzivna zelena, siva i braon obojenost (slika 36 C). U ćelijama hloroneme se detektuje granulast sadržaj obojen u sivo, koji se lokalizuje u blizini ćelijskog zida dve susedne ćelije (slika 36F).

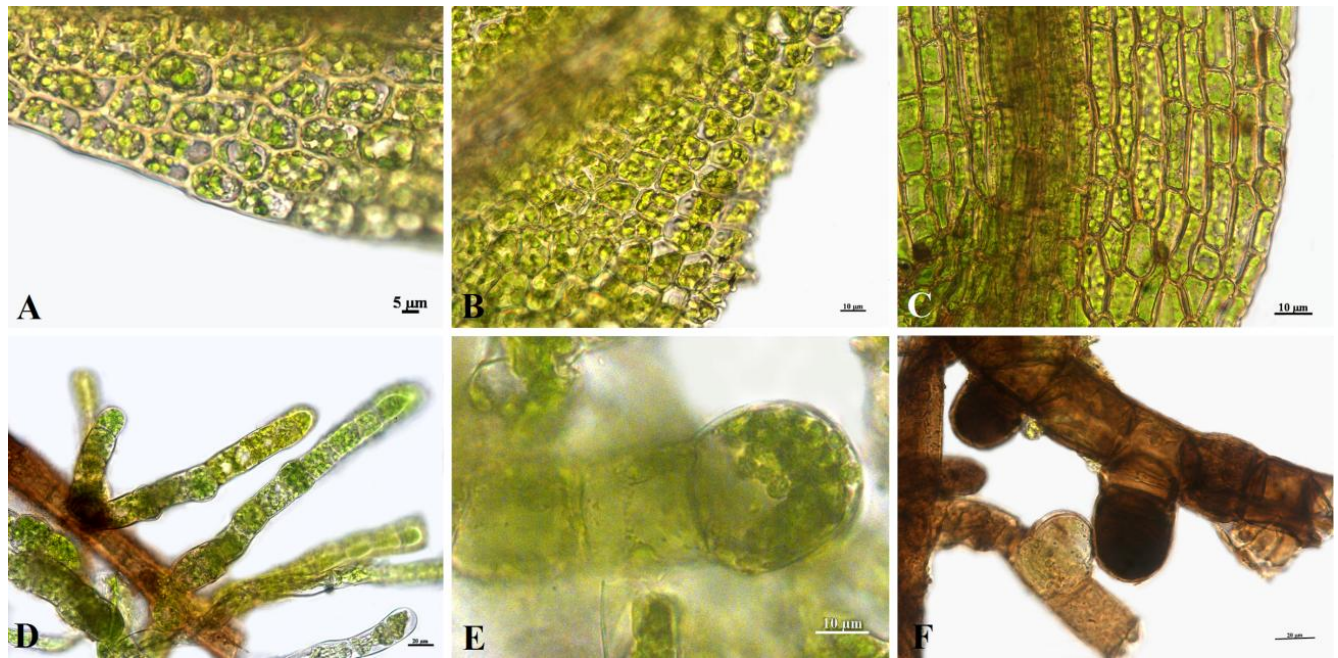
U eksperimentu II, egzogena ABA utiče na akumulaciju fenolnih jedinjenja u ćelijske zidove ćelija filoida (slika 37 B), što se uočava kao tamna obojenost na mikroskopskom preparatu. Pored toga, ćelije protoneme pokazuju jasnu reakciju sa FeCl<sub>3</sub>, što je dokaz prisustva fenolnih jedinjenja. Kod biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom NaCl nakon predtretmana ABA bojene reakcije su prisutne i veoma intenzivne kako u filoidu tako i u protonemalnim ćelijama. Kod protonema eksplantata gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 µM ABA i 250 mM NaCl, koje formiraju brahicite (slika 37 H), obojenost je prisutna, pa se pretpostavlja da se i u ovim strukturama skladište fenolna jedinjenja. Ovakav rezultat ukazuje na prisustvo velike količine fenola kod ove vrste u svim delovima biljke.



Slika 37. Histoheimska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem FeCl<sub>3</sub> kod vrste *E. hungaricus* u eksperimentu II. A) nulta kontrola (K<sub>0</sub>) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50 µM ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50 µM ABA + 250 mM NaCl – filoid; E) nulta kontrola (K<sub>0</sub>) – protonema; F) ABA kontrola – protonema; G) 50 µM ABA + 50 mM NaCl – protonema; H) 50 µM ABA + 250 mM NaCl – protonema

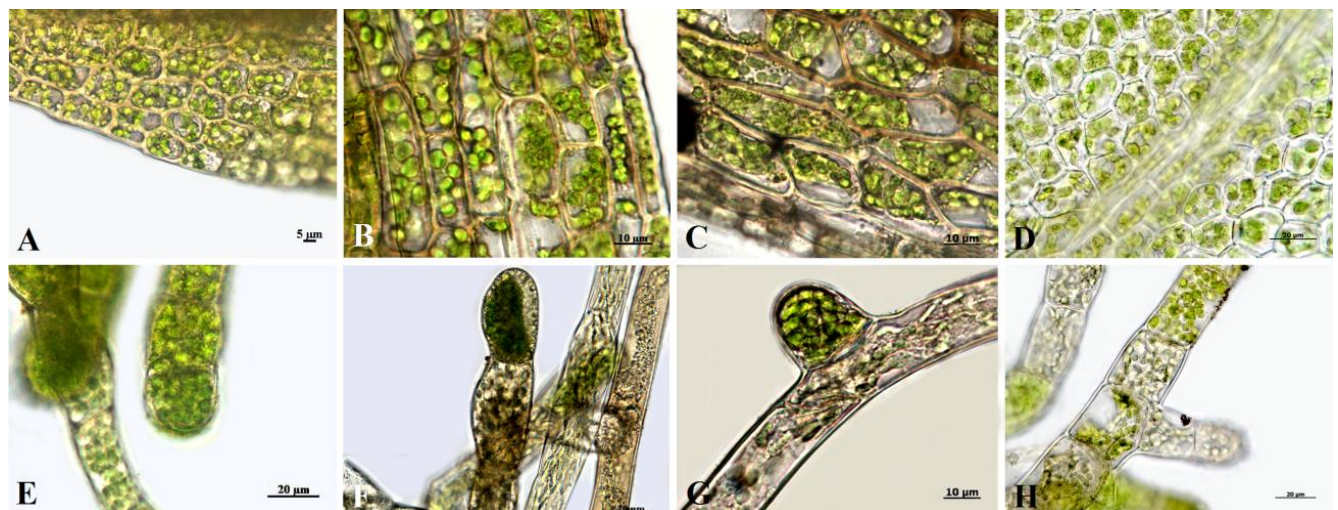
U kontrolnoj grupi biljaka vrste *H. heimii* zapaža se prisustvo fenolnih jedinjenja u citoplazmi ćelija filoida i protoneme na osnovu maslinasto-zelenog obojenja sadržaja ćelija (slika 38 A i D). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, slične bojene reakcije su evidentirane (slika 38 B i E). Sa druge strane, kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, obojenost je intenzivnija u ćelijskom zidu ćelija filoida, a zapaža se i zadebljanje ćelijskog zida (slika 38 C).





Slika 38. Histoheimska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem  $\text{FeCl}_3$  kod vrste *H. heimii* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E) 50 mM NaCl – protonema; F) 250 mM NaCl – protonema

Ukoliko se biljke *H. heimii* gaje na podlozi sa dodatkom ABA uočava se da dolazi do nakupljanja fenola u citoplazmi ćelija, a posebno u ćelijskom zidu (slika 39 B), što se moglo zapaziti kod sve tri ispitivane vrste. U protonemi se boji i citoplazma i granulasti sadržaj kauloneme. Slična reakcija sa  $\text{FeCl}_3$  se zapaža i kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA (slika 39 C i G). Za razliku od njih, kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa



Slika 39. Histoheimska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem  $\text{FeCl}_3$  kod vrste *H. heimii* u eksperimentu II. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 250 mM NaCl – filoid; E) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F) ABA kontrola – protonema; G) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 50 mM NaCl – protonema; H) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 250 mM NaCl – protonema

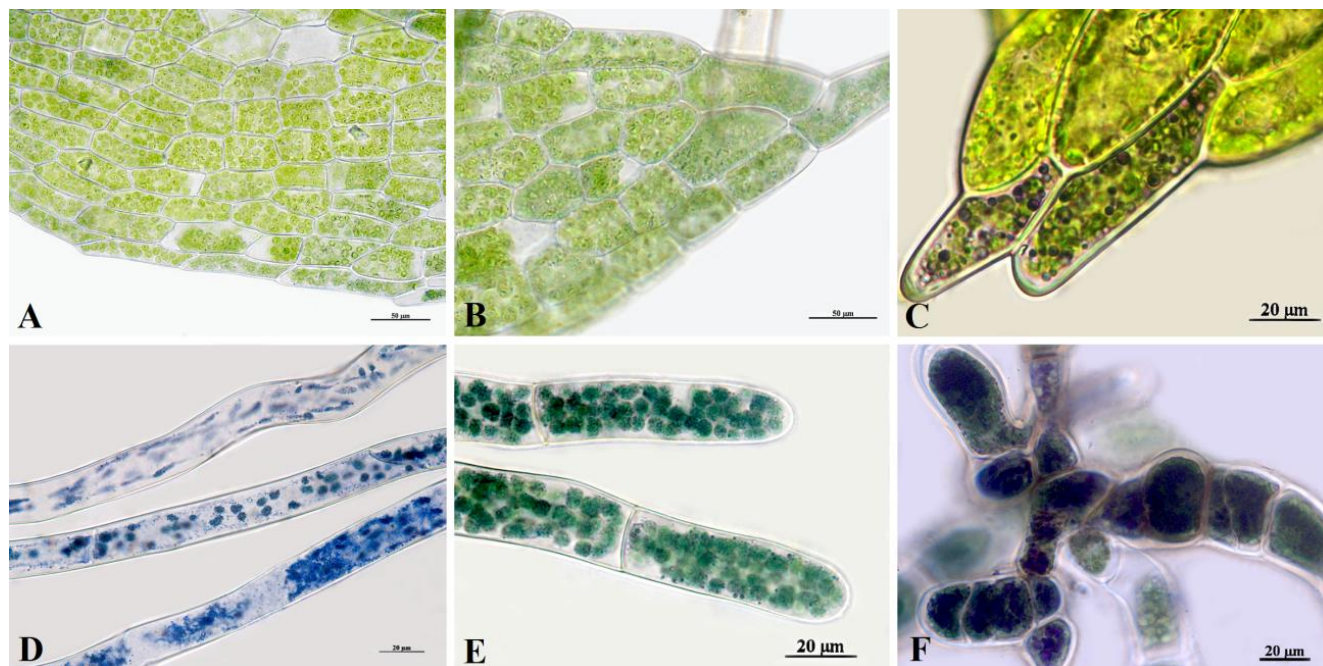
dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA bojena reakcija je slabija, što ukazuje na prisustvo manje količine fenolnih jedinjenja kod ovih biljaka.

Generalno, dobijeni rezultati dokazuju postojanje fenolnih jedinjenja kod sve tri vrste, kao i njihovu lokalizaciju pod uticajem ABA i NaCl. Može se zaključiti da ABA dovodi do potencijalno veće akumulacije fenolnih jedinjenja u ćelijskim zidovima. NaCl utiče na akumulaciju fenola u citoplazmi ćelije, ali se precizna lokalizacija ne može tvrditi zbog prisustva velikog broja hloroplasta u ćelijama.

#### 4.7.3. Određivanje terpena reakcijom sa NADI reagensom

Histohemijske analize terpena u ovoj disertaciji jasno ukazuju na postojanje značajne količine terpena lokalizovanih pretežno u protonemi sve tri ispitivane vrste mahovina.

Kod vrste *P. patens* se na osnovu bojenih reakcija zaključuje postojanje isparljivih jedinjenja u protonemi, s obzirom na to da plava boja ukazuje na postojanje isparljivih i/ili baznih terpena. U kaulonemalnim ćelijama se u citoplazmi zapažaju male sferične plave strukture bez specifične lokalizacije, dok se u hloronemalnim ćelijama ove strukture javljaju u blizini hloroplasta (slika 40 D). Ovakav rezultat ukazuje da je sinteza jedinjenja koja se akumuliraju u ovim strukturama u vezi sa hloroplastima, odnosno da se deo biosintetskog puta terpena dešava u hloroplastima. Kod biljaka gajenim na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl bojene reakcije u filoidima odsustvuju, kao i kod kontrolne grupe biljaka (slika 40 B), dok se u protonemi uočava veliki broj sitnih okruglih struktura rasutih po celoj citoplazmi, ali i lokalizovanih u blizini hloroplasta (slika 40 E).

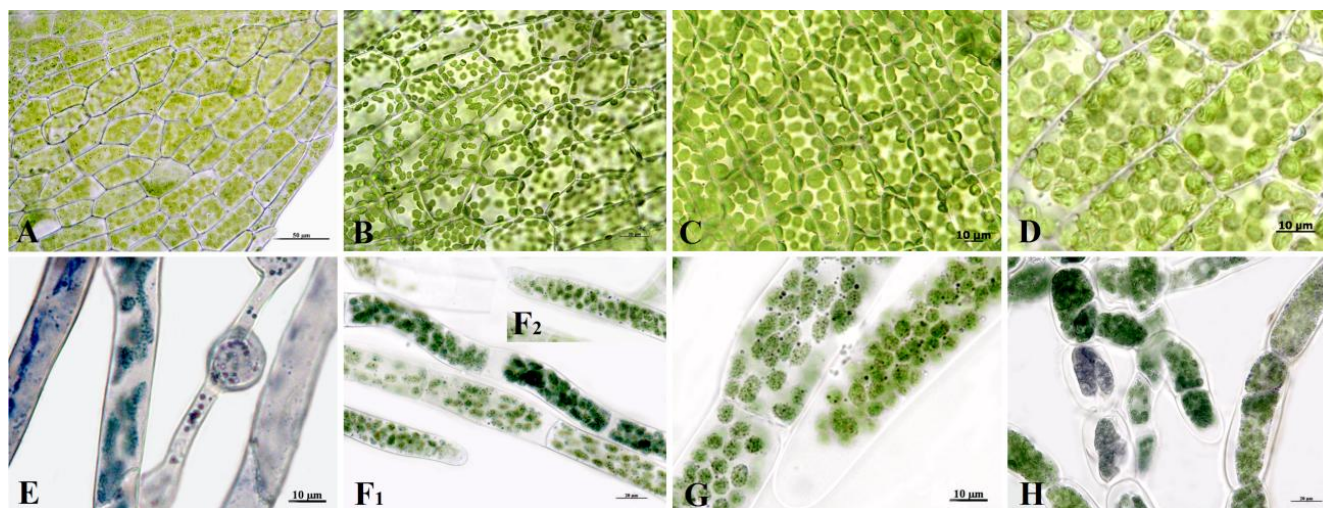


Slika 40. Histohemijska karakterizacija terpena korišćenjem Nadi reagensa kod vrste *P. patens* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E) 50 mM NaCl – protonema; F) 250 mM NaCl – protonema



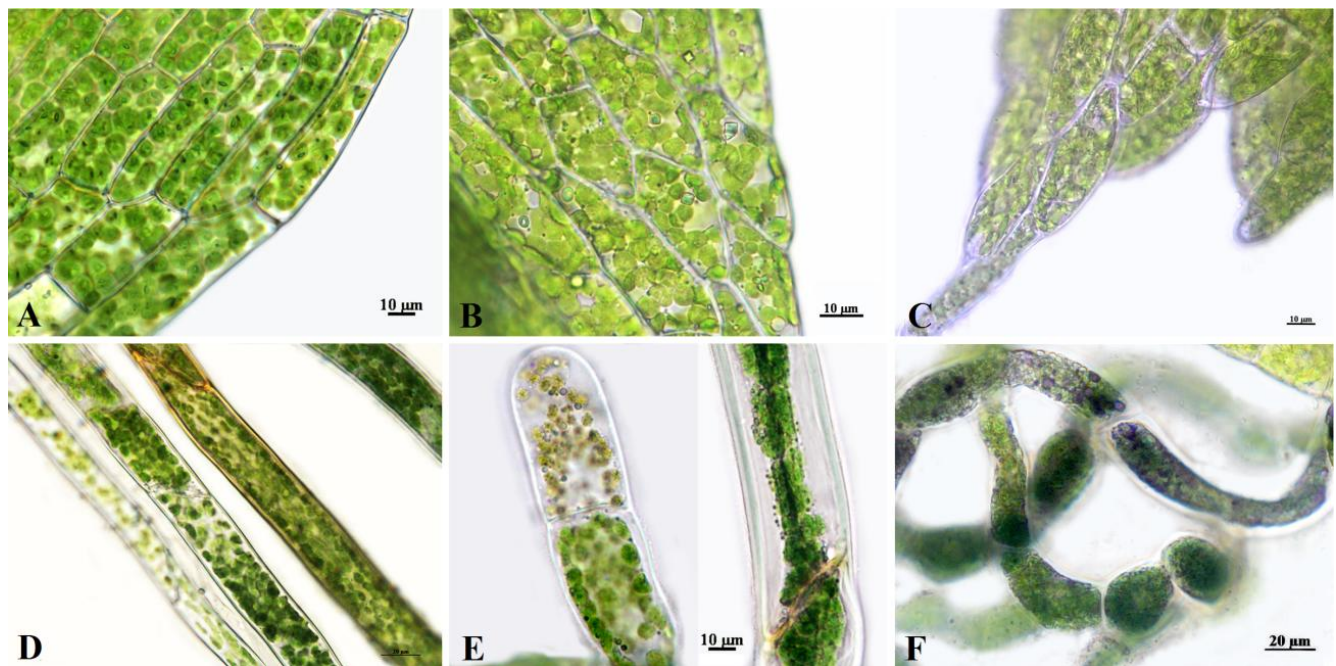
Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl u brahicitama se jasno uočava akumulacija terpena (slika 40 F), što se detektuje prisustvom intenzivno ljubičaste i plave boje. Nije moguće jasno utvrditi oblik obojenih struktura, s obzirom na veliku površinu koju zahvataju. Takođe, u vršnim ćelijama filoida *P. patens* se zapaža prisustvo diskretnih obojenih struktura koje ukazuju na prisustvo terpena (slika 30 C).

Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA bojena reakcija je nešto manjeg intenziteta u odnosu na kontrolnu grupu biljaka (slika 41 B i F). Sitne okrugle sive i plave strukture su prisutne u citoplazmi hloroneme, ali u značajno manjoj meri nego kod kontrolne grupe biljaka. Biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA poseduju značajan broj malih, obojenih struktura u citoplazmi protoneme, što ukazuje na postojanje lipidnih komponenti, a moguće i terpena (slika 41 G). Sa druge strane, kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA jasno se uočava prisustvo terpena na osnovu ljubičaste obojenosti unutašnjosti ćelija protoneme (slika 41 H). U filoidima ove grupe biljaka se uočavaju sitne sferične nakupine (slika 41 D), koje nisu primećene u prethodnim tretmanima kod *P. patens*. Pretpostavlja se da su to posebni kompartmenti u kojima se akumuliraju lipidna jedinjenja.



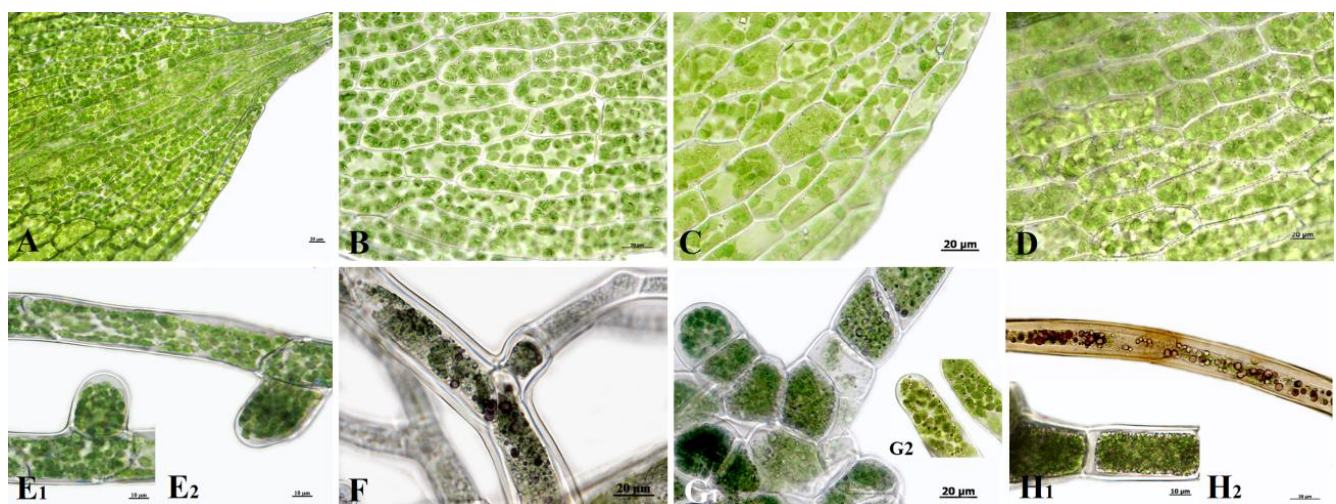
Slika 41. Histoheimijska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem Nadi reagensa kod vrste *P. patens* u eksperimentu II. . A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – filoid; E) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F1 i F2) ABA kontrola – protonema; G) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – protonema; H) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl - protonema

Kod vrste *E. hungaricus* nije zapaženo intenzivno bojenje, pa se pretpostavlja da terpeni nisu prisutni u većoj količini (slika 42 A i D). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl uočava se prisustvo velikog broja malih plavih i sivih struktura u citoplazmi protoneme, posebno u vršnim ćelijama i u kaulonemi (slika 42 E). Intenzivnija reakcija se zapaža kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa 250 mM NaCl, posebno u brahicitama gde se zapažaju velike sferične strukture koje se boje roze i ljubičasto (slika 42 F). U filoidima se nazire bojena reakcija, ali se ne može sa sigurnošću utvrditi postojanje terpena.



Slika 42. Histohemijska karakterizacija terpena korišćenjem Nadi reagensa kod vrste *E. hungaricus* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E) 50 mM NaCl – protonema; F) 250 mM NaCl – protonema

Egzogeno dodata ABA utiče na akumulaciju terpena u protonemi vrste *E. hungaricus* (slika 43 F). Mnogobrojne okrugle ljubičaste i plave strukture se uočavaju u citoplazmi protoneme, što ukazuje na prisustvo isparljivih i neisparljivih terpena. Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA, reakcija u protonemi je nešto manje uočljiva, iako je veliki broj sitnih okruglih struktura prisutan u citoplazmi (slika 43 G).

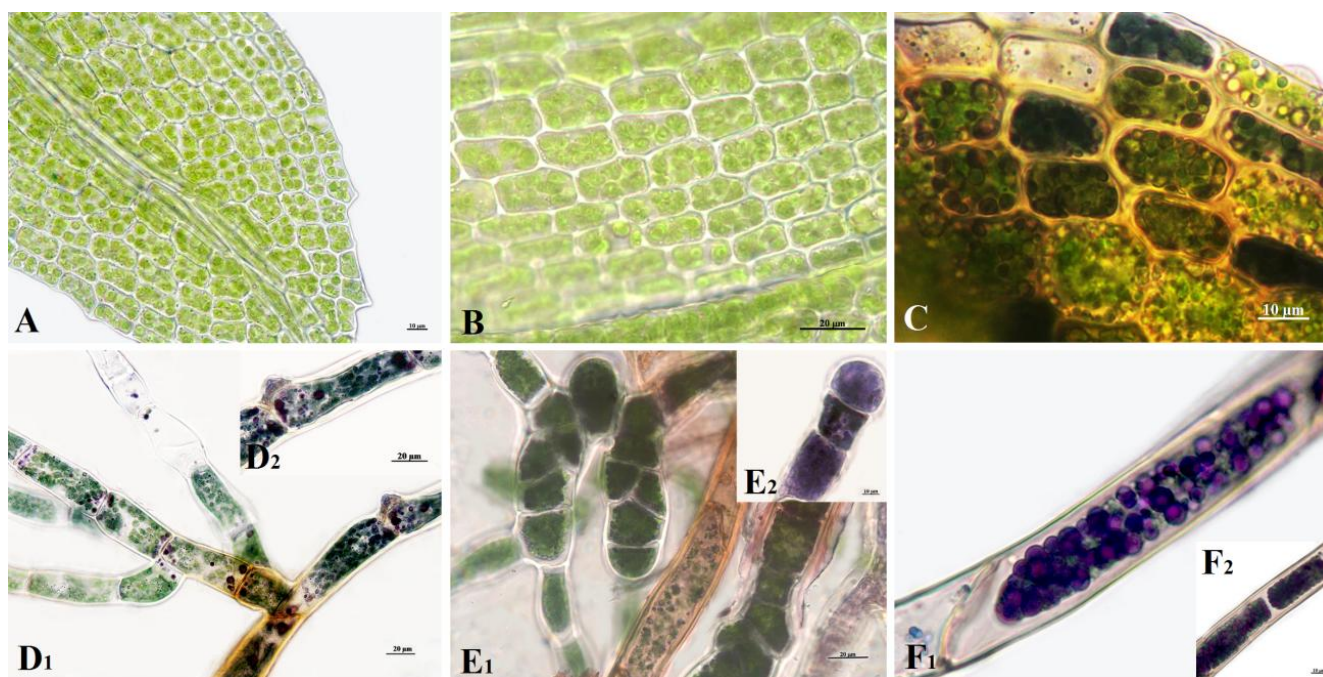


Slika 43. Histohemijska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem Nadi reagensa kod vrste *E. hungaricus* u eksperimentu II. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – filoid; E1 i E2) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F) ABA kontrola – protonema; G1 i G2) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – protonema; H) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – hloronema; H2) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – kaulonema



U filoidima se može detektovati bojena reakcija, pa se smatra da se terpeni ne skladište u ovom delu biljaka, već u protonemi. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM nakon predtretmana ABA uočava se intenzivna reakcija u kaulonemi, pri čemu se jasno boji granulasti sadržaj (slika 43 H2). U hloronemi je reakcija manje izražena, ali postoji, što ukazuje na akumulaciju manje količine terpena. U filoidima se sa sigurnošću može utvrditi prisustvo terpena.

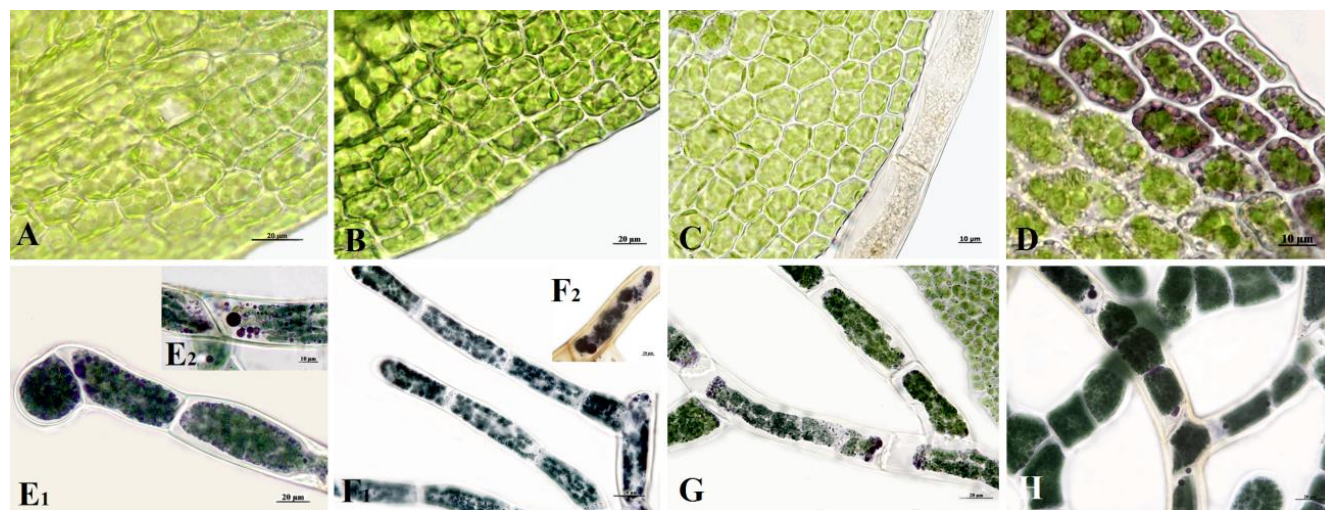
Reakcija sa Nadi reagensom ukazuje na prisustvo značajne količine terpena u kontrolnoj grupi biljaka vrste *H. heimii* (slika 44 A i D). Terpeni se vizuelizuju u citoplazmi protonemalnih ćelija kao sferične, okrugle strukture, crvenkasto-ljubičaste ili plave boje. U vršnim delovima hloroneme zapaženo je prisustvo mnogobrojnih ljubičastih sferičnih struktura lokalizovanih u blizini membrane. U okviru hloronemalnih ćelija, terpeni se lokalizuju u citoplazmi u obliku veoma malih, diskretnih tamno plavih kapljica. Međutim, mnoštvo velikih roze i ljubičastih struktura je prisutno u blizini membrane i ćelijskog zida. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl uočava se intenzivna reakcija u protonemi. Akumuliraju se ljubičaste kapljice, koje podsećaju na lipidne kapi, u citoplazmi hloronemalnih ćelija, veoma blisko pozicioniranih ćelijskom zidu (slika 44 E). Nije uočena reakcija u filoidima. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl mnogobrojne ljubičaste i roze strukture sa nejasnim granicama (nedefinisanim oblicima) su uočene u citoplazmi (slika 44 F). Moguće je da se terpeni oslobađaju iz ovakvih struktura i degraduju. Pored protoneme u kojoj se jasno vidi reakcija sa Nadi reagensom, u filoidima se takođe zapaža akumulacija terpena kod *H. heimii* (slika 44 C) gde je pored mnogobrojnih obojenih struktura zapaženo prisustvo jasnih bezbojnih struktura, koje potencijalno sadrže druga lipidna jedinjenja ili su oslobodile terpene u citoplazmu.



Slika 44. Histochemijska karakterizacija terpena korišćenjem Nadi reagensa kod vrste *H. heimii* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D1 i D2) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E1 i E2) 50 mM NaCl – protonema; F1 i F2) 250 mM NaCl – protonema

Biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA pokazuju jasnu reakciju na terpene, kao što je opisano i za kontrolnu grupu biljaka (slika 45 F1, F2), osim što se kod ovih biljaka veći broj

struktura boji u plavo, ukazujući na promenu sastava terpena koji se nalaze u protonemi. Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA, reakcija je takođe uočljiva, ali manjeg intenziteta u poređenju sa kontrolom. Može se pretpostaviti da se količina terpena smanjuje. Za razliku od njih, kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA jasno se uočava reakcija u filoidima, posebno u citoplazmi (slika 45 D), ali i u protonemi, gde se velike roze i ljubičaste kapljice akumuliraju u citoplazmi, a bliže ćelijskim zidovima između dve susedne ćelije (slika 45 H). Pored velikih okruglih struktura, zapažaju se i elipsoidne, ali i manje strukture sive boje što ukazuje na skladištenje različitih lipofilnih jedinjenja.



Slika 45. Histohemijska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem Nadi reagensa kod vrste *H. heimii* u eksperimentu II. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – filoid; E1 i E2) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F1 i F2) ABA kontrola – protonema; G) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – protonema; H) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl - protonema

Korišćenjem tehnike bojenja preparata sa Nadi reagensom nesumnjivo je dokazano prisustvo terpena u sve tri ispitivane vrste. Utvrđeno je da između vrsta postoji razlika u intenzitetu reakcije sa Nadi reagensom, što ukazuje na razliku u tipu terpena koji se sintetiše i akumulira, ali i u količini ovih jedinjenja.

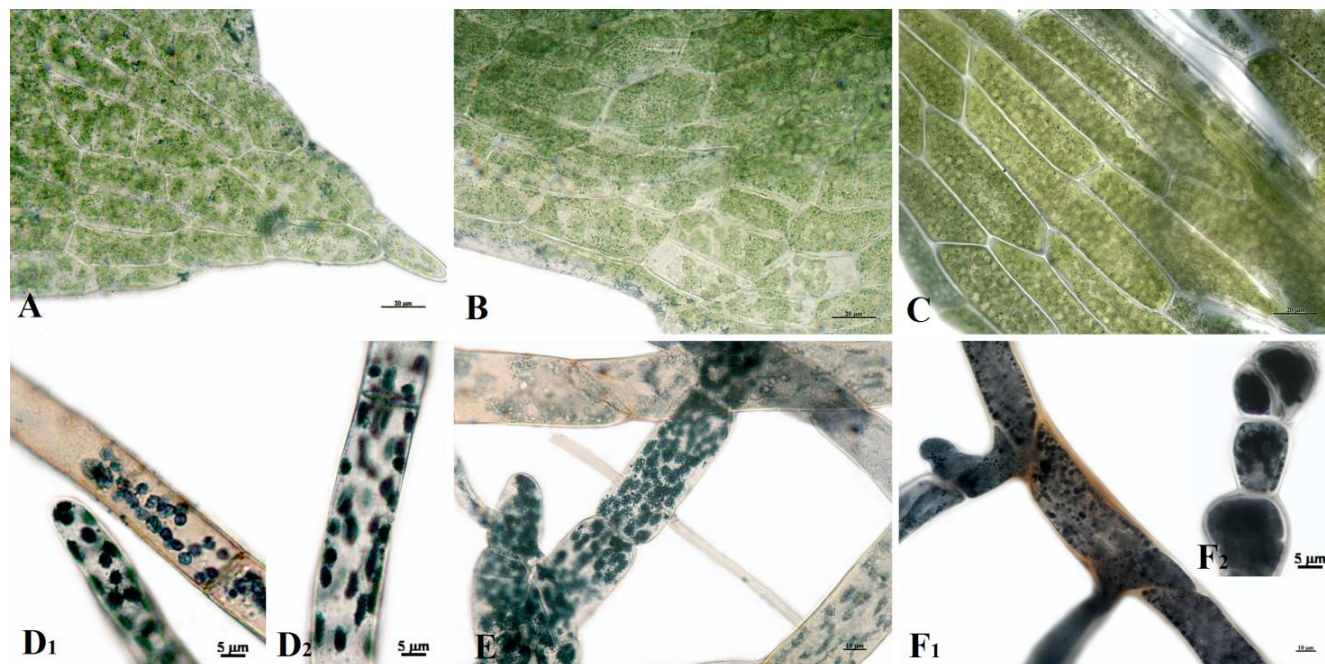
#### 4.7.4. Određivanje lipida reakcijom sa *Sudan Black B* bojom

Bojene reakcije koje ukazuju na prisustvo ukupnih lipida i lipofilnih jedinjenja su detektovane kod sve tri ispitivane vrste mahovina korišćenjem *Sudan Black B* boje i u potpunom su skladu sa rezultatima dobijenim u reakciji sa Nadi reagensom, koja ukazuje na prisustvo terpena.

U kontrolnoj grupi biljaka vrste *P. patens* uočeno je mnoštvo sitnih tamno obojenih okruglih struktura u blizini hloroplasta u filoidima (slika 46 A), dok se u protonemi intenzivne bojene reakcije mogu uočiti kao plavo-teget do crna obojenja granulastog sadržaja u kaulonemi i hloroplasta u hloronemi (slika 46 D1 i D2). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, reakcija koja ukazuje na prisustvo lipida u filoidima je nešto manje uočljiva (slika 46 B), dok je u protonemi jasno vidljivo prisustvo velikog broja tamno obojenih sitnih tačkastih struktura (slika 46 E). U filoidima biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, tamnije se boji citoplazma ćelije, a ne samo diskretne strukture koje su prethodno zapažene u filoidima (slika 46 C). U

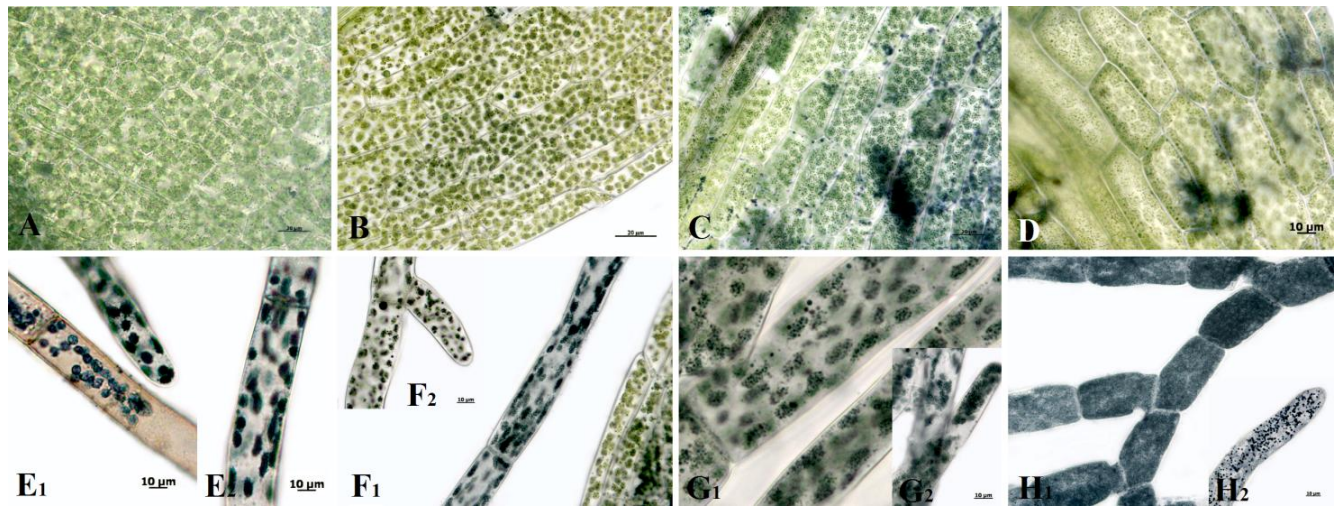


protonemi, ali i brahicitama koje se formiraju kod ovih biljaka, intenzivna teget-crna boja koja se formira u obliku kapljica ukazuje na prisustvo značajne količine ukupnih lipida, koji se posebno akumuliraju u strukturama koje podsećaju na uljane kapljice (slika 46 F1 i F2).



Slika 46. Histoheimska karakterizacija lipida korišćenjem *Sudan Black B* boje kod vrste *P. patens* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D1 i D2) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E) 50 mM NaCl – protonema; F1 250 mM NaCl – protonema; F2) 250 mM NaCl – brahicite

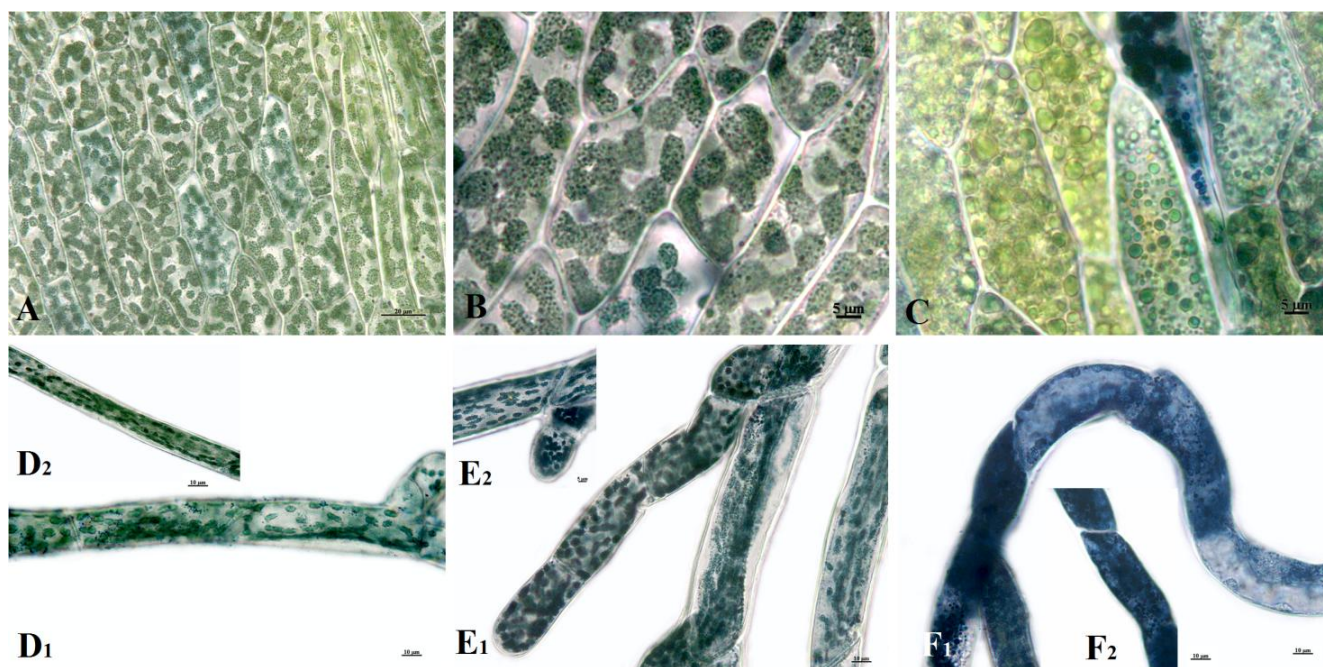
Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA zapaža se svetlija boja u citoplazmi filoida kod *P. patens* (slika 47 B), što ukazuje na promenu sastava ili sadržaja lipida. U protonemi se jasno zapažaju plavo-crne reakcije u blizini hloroplasta, ali i svetlija obojenja u okviru specifičnih kapljica (slika 47 B1). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA jasna je reakcija u protonemi u vidu sitnih teget-crnih tačkica, ali i u filoidu (slika 47 C i G). Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA-om, zapaža se intenzivnija reakcija sa *Sudan* bojom posebno u protonemi, pri čemu se pored diskretnih okruglih struktura boji i celokupna citoplazma (slika 47 H1 i H2). U filoidu se takođe uočava reakcija obojenja (slika 47 D).



Slika 47. Histoheimijska karakterizacija lipida korišćenjem *Sudan Black B* boje kod vrste *P. patens* u eksperimentu II. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 250 mM NaCl – filoid; E1 i E2) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F1 i F2) ABA kontrola – protonema; G1 i G2) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 50 mM NaCl – protonema; H1 i H2) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 250 mM NaCl - protonema

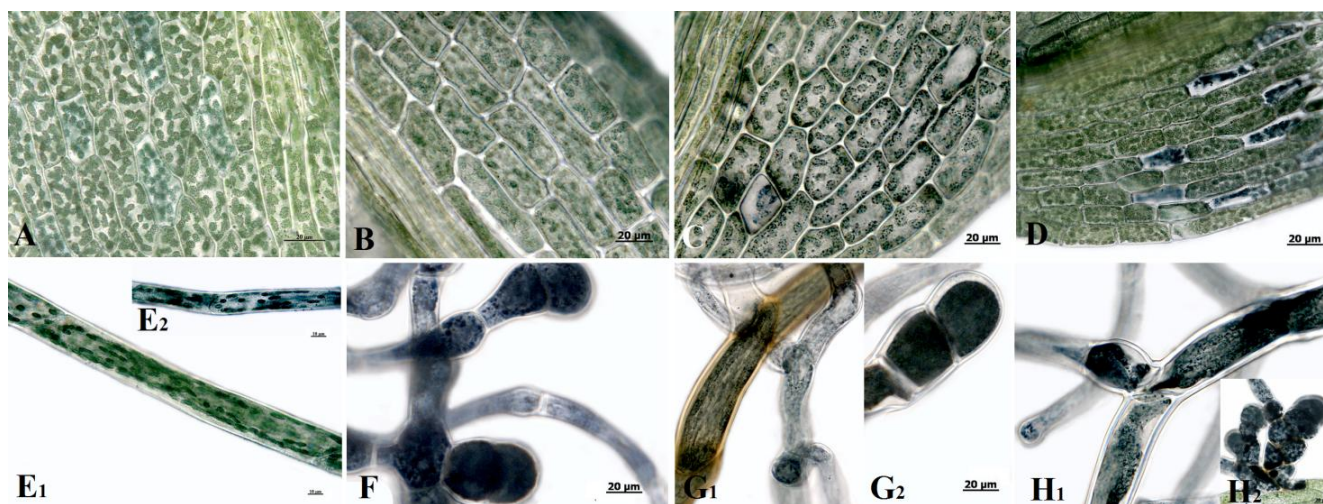
Kod kontrolnih biljaka vrste *E. hungaricus* utvrđeno je prisustvo lipida u filoidu i u protonemi, ali je reakcija nešto svetlijih plavih boja (slika 48 A i D) nego što je zapaženo kod *P. patens* (slika 46 A i D), što ukazuje na kvalitativno različit sastav lipida koji se kod ove dve vrste javlja. Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl bojena reakcija je intenzivna u predelu hloroplasta u filoidima i predstavljena je sitnim crnim tačkicama (slika 48 B), dok je kod protoneme prisutna u okviru krupnijih struktura u citoplazmi (slika 48 E1 i E2). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl zapaženo je prisustvo struktura sličnih lipidnim kapima u filoidima, koje se ne boje intenzivno plavo, već zeleno, što ukazuje na prisustvo neke druge grupe sekundarnih metabolita koja se akumulira (slika 48 C). U protonemi ovih biljaka je zapažena intenzivna reakcija pri čemu se teget boje strukture nalik kapljicama, ali i celokupni sadržaj citoplazme kauloneme (slika 48 F1).





Slika 48. Histohemijska karakterizacija lipida korišćenjem *Sudan Black B* boje kod vrste *E. hungaricus* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D1 i D2) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E1 i E2) 50 mM NaCl – protonema; F1 i F2) 250 mM NaCl – protonema

Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA, reakcija se uočava kao teget-crna obojenja kapljicastruktura u protonemi i brahicitama koje formira vrsta *E. hungaricus* (slika 49 F), dok je u filoidu reakcija slična kao i kod kontrolne grupe biljaka. Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA, reakcija je prisutna i u filoidu u obliku sitnih tačkica na hloroplastima, ali i u protonemi. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA zapaža se veoma intenzivna teget-crna boja u protonemi i novim pupoljcima (slika 49 H2), kao i u filoidu.

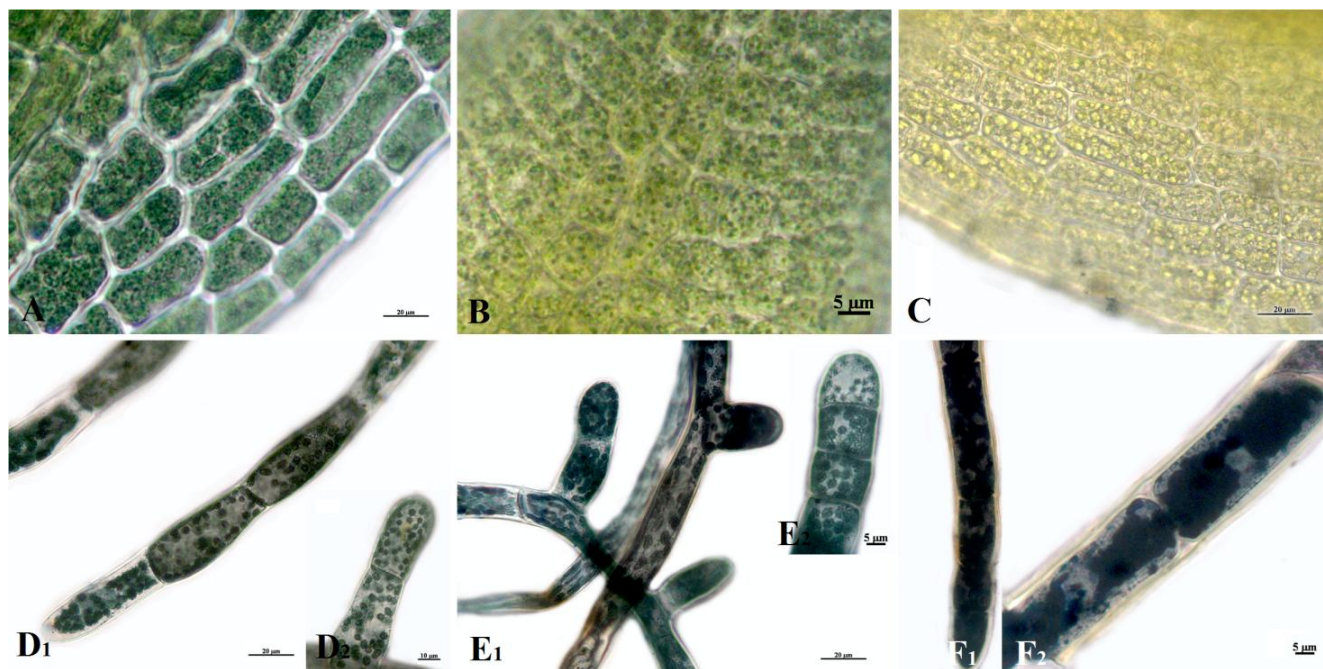


Slika 49. Histohemijska karakterizacija lipida korišćenjem *Sudan Black B* boje kod vrste *E. hungaricus* u eksperimentu II. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – filoid; E1 i E2) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F) 50  $\mu$ M ABA – protonema; G1 i G2) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – protonema; H1 i H2) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – protonema



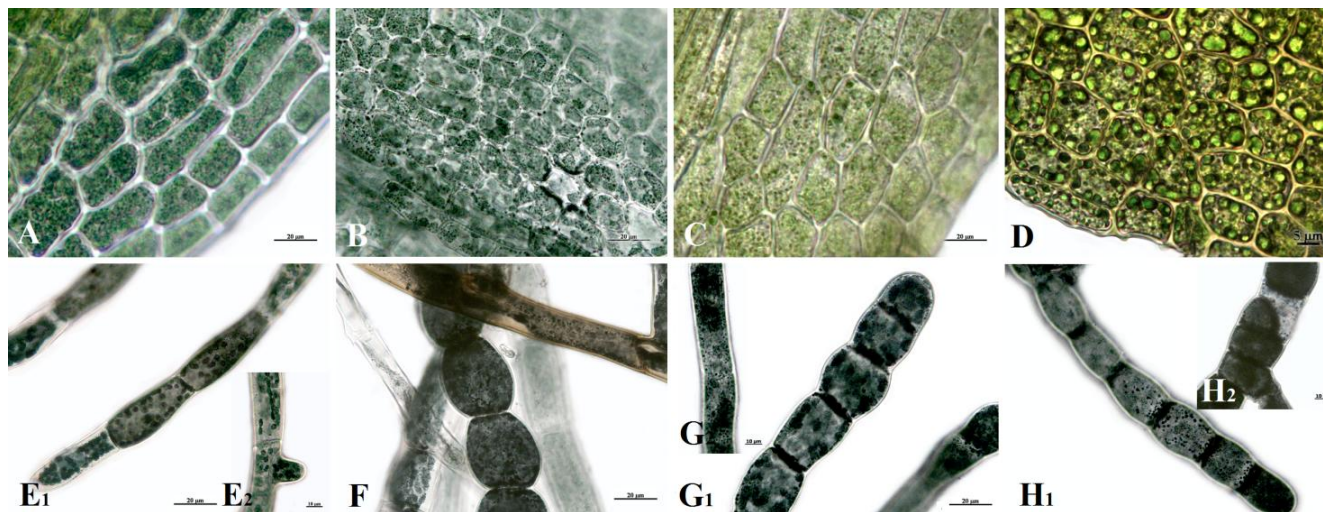
ABA kontrola – protonema; G1) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – protonema, G2) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – pupoljak; H1) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – protonema; H2) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – pupoljak na filoidu

Evidentno je prisustvo lipida u filoidima i protonemi kontrolne grupe biljaka vrste *H. heimii* (slika 50 A i D). Reakcija koja se detektuje je slična po boji i obliku kao kod prethodno opisanih vrsta. Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl uočava se intenzivna reakcija u filoidu u obliku mnogobrojnih, sitnih, crnih tačkica (slika 50 B), dok se u protonemi uočava kao obojenje hloroplasta u teget (slika 50 E). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl u filoidu nije zabeležena reakcija, ali jeste prisustvo velikog broja struktura koje se boje (što je već zapaženo kod *H. heimii*), dok je reakcija u protonemi, posebno u kaulonemi, intenzivna pri čemu se boji celokupan sadržaj ćelija koji podseća na uljast sadržaj, nedefinisanog oblika (slika 50 H).



Slika 50. Histoheimska karakterizacija lipida korišćenjem *Sudan Black B* boje kod vrste *H. heimii* u eksperimentu I A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D1 i D2) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E1 i E2) 50 mM NaCl – protonema; F1 i F2) 250 mM NaCl – protonema

Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA, reakcija sa sudan bojom je prisutna i intenzivna (slika 51 B i D), a posebno u brahicitama se uočava kao teget-crni kapljičasti sadržaj (slika 51 D). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA-om, bojena reakcija u filoidu je manje intenzivna, dok se u protonemama kapljičasti sadržaj boji i dominantno je prisutan u blizini ćelijskih zidova koje dele dve susedne ćelije (slika 51 G2). Pored toga, u protonemi se intenzivno boji sadržaj ćelija kauloneme, što se detektuje kao sitne teget-crne okrugle strukture (slika 51 G1). Bojena reakcija izostaje u filoidima biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA (slika 51 D), mada se zapažaju specifične nebojene strukture u ćelijama slične kao i kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl u eksperimentu I (slika 50 C). U protonemama i brahicitama koje se formiraju, lipidi se zapažaju kao teget-crna obojenja pozicionirana blisko ćelijskim zidovima (slika 51 H1 i H2).



Slika 51. Histochemijska karakterizacija lipida korišćenjem *Sudan Black B* boje kod vrste *H. heimii* u eksperimentu II. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 250 mM NaCl – filoid; E1 i E2) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F) ABA kontrola – protonema; G1 i G2) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 50 mM NaCl – protonema; H1 i H2) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 250 mM NaCl - protonema

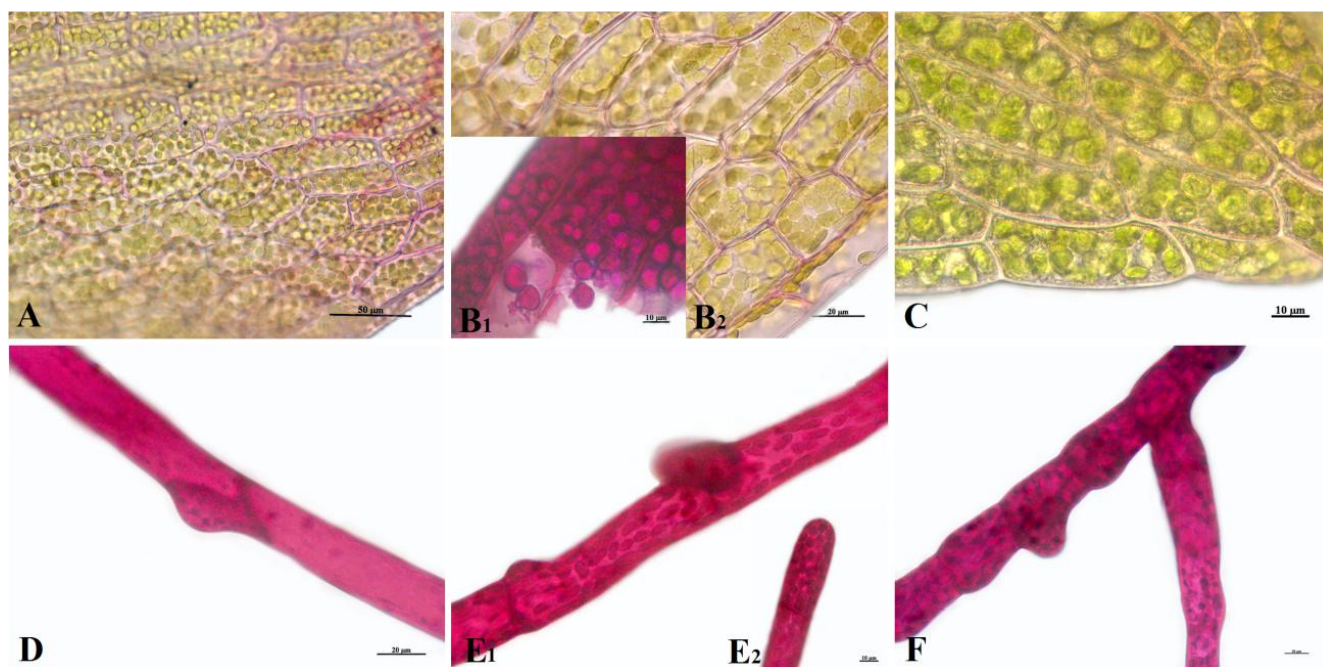
Rezultati dobijeni za prisustvo ukupnih lipida i lipofilnih jedinjenja su u skladu sa rezultatima dobijenim za potvrdu prisustva terpena kod sve tri ispitivane vrste, što ukazuje da pored terpena ove vrste akumuliraju i druge klase lipofilnih jedinjenja.

#### 4.7.5. Određivanje polisaharida PAS reakcijom

Šif reagens je korišćen za bojenje polisaharida u ovoj disertaciji. On formira specifične reakcije svetlo crvene, roze ili ciklama boje sa polisaharidima, koje su evidentne kod sve tri ispitivane vrste mahovina.

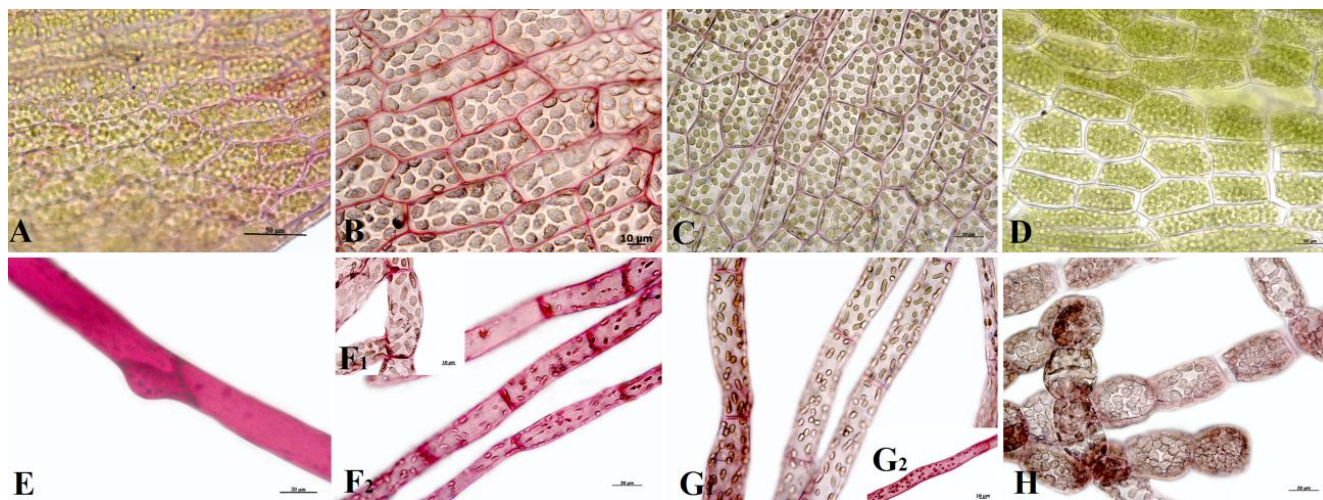
U kontrolnoj grupi biljaka vrste *P. patens* ugljeni hidrati su detektovani u ćelijskom zidu filoida i protoneme (slika 52 A i D). Moguće je da je i unutrašnjost protoneme obojena, što ukazuje na postojanje solubilnih formi ugljenih hidrata u citoplazmi (slika 52 D). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl. osim u ćelijskim zidovima. šećeri se detektuju u hloroplastima filoida (slika 52 B1), što je pokazatelj postojanja skroba. Ova mikroskopska fotografija je zapravo dokaz da dolazi do bojenja hloroplasta, što je inače teško uočiti na drugim mikrografijama zbog bojenja ćelijskog zida u crveno, jer ta boja maskira bojene reakcije unutar ćelije. U protonemi ovih biljaka se može zapaziti intenzivna reakcija sa Šif reagensom, pa se pretpostavlja povećana akumulacija šećera u hloroplastima i ćelijskom zidu protoneme (slika 52 E). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nešto je manje uočljivo bojenje ćelijskih zidova u filoidu (slika 52 C). Protoneme se intenzivno boje, slično kao i kod biljaka gajenih na podlozi sa 50 mM NaCl, ali se osim hloroplasta unutar ćelija protoneme zapažaju tamnije obojene nakupine u citoplazmi (slika 52 F).





Slika 52. Histoheimska karakterizacija terpena korišćenjem Šif reagensa kod vrste *P. patens* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B1 i B2) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E1 i E2) 50 mM NaCl – protonema; F) 250 mM NaCl – protonema

Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA uočava se intenzivno bojenje ćelijskih zidova kako u filoidima, tako i protonemi vrste *P. patens* (slika 53 B i F), što nesumnjivo pokazuje postojanje ugljenih hidrata. Dodatno se u unutrašnjosti protoneme boje hloroplasti i granulasti sadržaj u citoplazmi, što potencijalno ukazuje na akumulaciju šećera u odvojenim kompartmanima citoplazme (slika 53 F2).

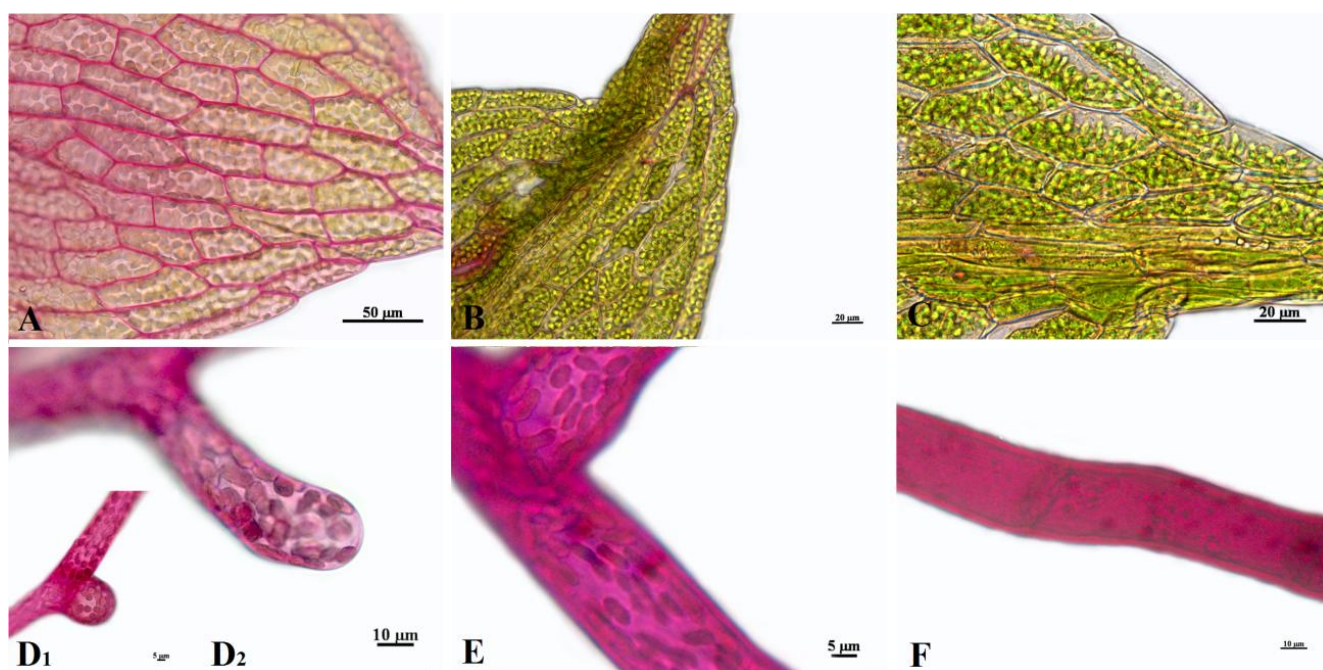


Slika 53. Histoheimska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem Šif reagensa kod vrste *P. patens* u eksperimentu II. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – filoid; E) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F1 i F2) ABA kontrola – protonema; G1 i G2) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – protonema; H) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl - protonema



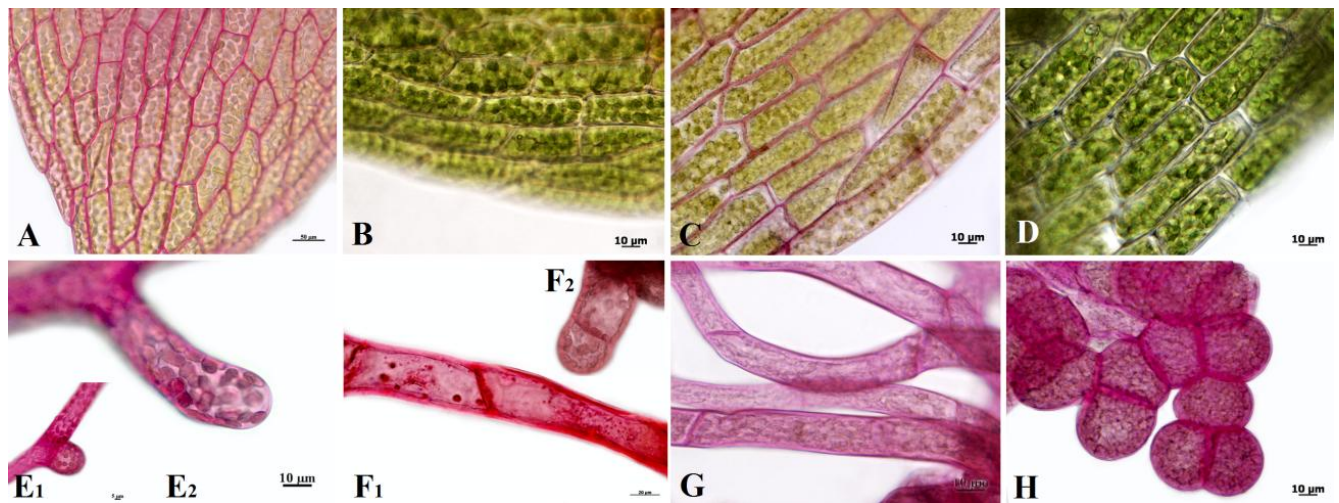
Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM nakon predtretmana sa ABA uočljivo je postojanje crvene obojenosti u ćelijskim zidovima filoida i protoneme, ali je intenzitet boje nešto slabiji nego u kontrolnoj grupi biljaka (slika 53 C i G). Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl reakcija je slična kao i kod prethodno opisane grupe u protonemi, ali se u filoidu ne mogu zapaziti reakcije koje dokazuju postojanje šećera (slika 53 D).

U kontrolnoj grupi biljaka vrste *E. hungaricus* zapaža se prisustvo bojene reakcije u ćelijskim zidovima filoida i protoneme, ali ne i u citoplazmi i hloroplastima (slika 54 A i D). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl slabija reakcija se uočava u filoidu, dok u protonemi intenzivno roze i ciklama boja jasan dokaz prisustva šećera (slika 54 E). Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl bojena reakcija je slična kao i kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl, odnosno, intenzivno se boji ćelijski zid i unutrašnjost ćelija protoneme, dok reakcija u filoidu ne može jasno ukazati na prisustvo šećera (slika 54 C i F).



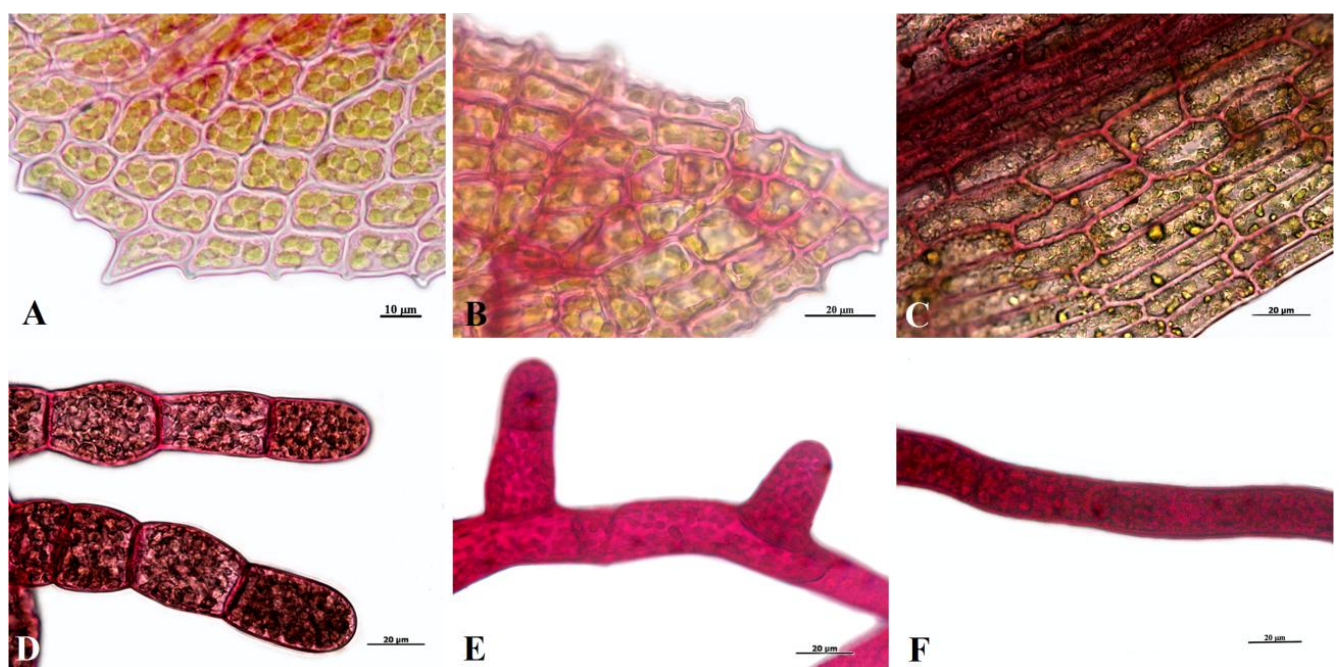
Slika 54. Histoheimska karakterizacija terpena korišćenjem Šif reagensa kod vrste *E. hungaricus* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D1 i D2) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E) 50 mM NaCl – protonema; F) 250 mM NaCl – protonema

Egzogeno dodata ABA u hranljivu podlogu utiče na smanjenje intenziteta bojene reakcije sa Šif reagensom u filoidima vrste *E. hungaricus* (slika 55 B). Sa druge strane, reakcija u protonemi je vrlo jasna i ukazuje na prisustvo šećera u ćelijskim zidovima (slika 55 F). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA-om uočljiva je bojena reakcija u ćelijskim zidovima filoida i protoneme (slika 55 C i G), ali ne i unutrašnjosti, kao što je prethodno zapaženo u ekperimentu I (slika 54). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA, reakcija sa Šif reagensom nije detektovana u filoidima, dok se jasno uočava u ćelijskim zidovima brahicita koje *E. hungaricus* formira u odgovoru na egzogeni ABA i 250 mM NaCl (slika 55 H).



Slika 55. Histoheimska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem Šif reagensa kod vrste *E. hungaricus* u eksperimentu II. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 250 mM NaCl – filoid; E1 i E2) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F1 i F2) ABA kontrola – protonema; G) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 50 mM NaCl – protonema; H) 50  $\mu\text{M}$  ABA + 250 mM NaCl – protonema

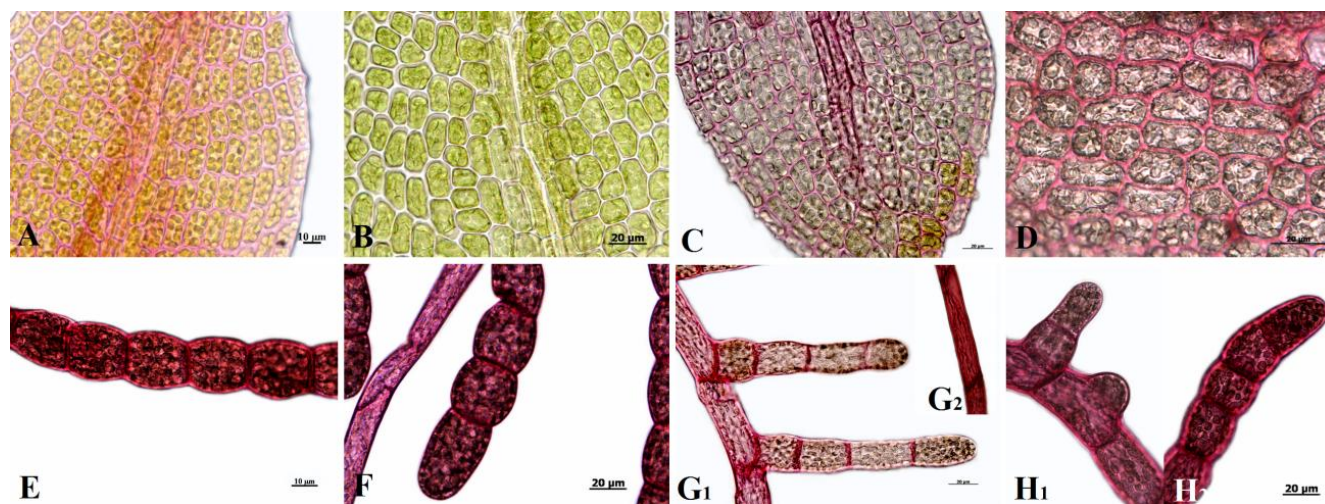
U kontrolnoj grupi biljaka vrste *H. heimii* detektuje se prisustvo ugljenih hidrata u ćelijskim zidovima filoida i protoneme (slika 56 A i D). U protonemi se pretpostavlja da se delimično boji i citoplazma. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl bojena reakcija je intenzivnija, jasno se uočava ciklama obojenosti ćelijskih zidova filoida i ćelijskih zidova i unutrašnjosti protoneme (slika 56 B i E). Još intenzivnija reakcija se uočava u protonemi biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, gde se boji celokupna unutrašnjost ćelije (slika 56 F). U filoidu se zapaža jasna tamno crvena boja ćelijskih zidova (slika 56 C).





Slika 56. Histoheмиjska karakterizacija terpena korišćenjem Šif reagensa kod vrste *H. heimii* u eksperimentu I. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) 50 mM NaCl – filoid; C) 250 mM NaCl – filoid; D) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; E) 50 mM NaCl – protonema; F) 250 mM NaCl – protonema

Kod biljaka vrste *H. heimii* gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA zapaža se slična reakcija kao i kod vrste *E. hungaricus*. U filoidima nije bilo moguće detektovati bojenu reakciju, dok se ćelijski zidovi i unutrašnjost ćelija protoneme jasno boje tamno crveno (slika 57 B i F). Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA reakcija u filoidima se uočava u ćelijskim zidovima, kao i u protonemi, koja je nešto slabije obojena nego u kontrolnoj grupi biljaka (slika 57 C i G). Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nakon predtretmana ABA reakcija je intenzivnija, što ukazuje na eventualno postojanje veće količine šećera u ćelijskom zidu i citoplazmi protoneme (slika 57 H).



Slika 57. Histoheмиjska karakterizacija fenolnih jedinjenja korišćenjem Šif reagensa kod vrste *H. heimii* u eksperimentu II. A) nulta kontrola ( $K_0$ ) – filoid; B) ABA kontrola – filoid; C) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – filoid; D) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – filoid; E) nulta kontrola ( $K_0$ ) – protonema; F) ABA kontrola – protonema; G1 i G2) 50  $\mu$ M ABA + 50 mM NaCl – protonema; H) 50  $\mu$ M ABA + 250 mM NaCl – protonema

Polisaharidi su histoheмиjskim tehnikama detektovani u membrani i ćelijskom zidu protoneme i filoida kod kontrolne grupe biljaka sve tri ispitivane vrste. Ipak, brio-halofite, sudeći po intenzitetu obojenosti, pokazuju nešto jaču reakciju u poređenju sa vrstom *P. patens* u filoidima, pa se može pretpostaviti da su različiti tipovi šećera dominantno prisutni kod brio-halofita.

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Analiza morfo-genetskih parametara

Uticaj stresa izazvanog NaCl se prvenstveno može zapaziti na morfo-anatomskom nivou, s obzirom na to da izaziva vidljive promene kod biljaka. Nakon dugotrajnog gajenja biljaka na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl, zapaženo je da procenat preživljavanja opada proporcionalno sa porastom koncentracije NaCl. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 500 mM NaCl mogu se uočiti pojedinačno preživele biljke (tabela 3), te se može pretpostaviti da postoji mogućnost oporavka nakon prestanka delovanja stresnog faktora. Ovakav rezultat je očekivan za brio-halofitne vrste *E. hungaricus* i *H. heimii* i u skladu je sa činjenicom da ove vrste nastanjuju područja sa povećanom koncentracijom soli u podlozi. Pored toga, dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima morfo-genetskih parametara za navedene vrste (Vujičić 2016). U literaturi postoje podaci da halofite generalno mogu da rastu i razvijaju se na podlogama u kojima je koncentracija NaCl 300 mM (Tester & Davenport 2003). Za razliku od njih, nehalofitna mahovina *P. patens* preživljava u veoma visokom procentu (tabela 3), što nije u potpunosti očekivano. Međutim, slična zapažanja su prisutna u literaturi i pretpostavljaju da je ova vrsta veoma tolerantna na stres izazvan solima, osmotski stres i sušu (Frank *et al.* 2005) i da je ovakav odgovor donekle u skladu sa njenom životnom strategijom. Ukoliko se biljke postepeno izlažu povećanim koncentracijama NaCl, zapaža se da ni veoma visoke koncentracije NaCl (do 600 mM) nemaju u potpunosti inhibitoran efekat na morfologiju i metabolizam kod *P. patens* (Frank *et al.* 2005; Benito & Rodriguez-Navarro 2003).

Na osnovu rezultata za IM prikazanih na grafiku 2, možemo zaključiti da sve tri ispitivane vrste reaguju slično u pogledu formiranja novih pupoljaka i izdanaka. Niske koncentracije NaCl imaju stimulatoran efekat na formiranje novih pupoljaka u odnosu na kontrolnu grupu biljaka. Koncentracije NaCl preko 100 mM ispoljavaju inhibitoran efekat na IM kod *P. patens*, dok se kod halofita ne mogu uočiti novi izdanci. Očigledno je smanjenje IM kod biljaka gajenih na visokim koncentracijama NaCl u vezi sa preživljavanjem u uslovima stresa, pošto se na ovaj način potencijalno štedi energija potrebna za sintezu protektivnih jedinjenja za odbranu od stresa. Ovakve promene se moguće dešavaju zbog toga što niske koncentracije NaCl predstavljaju blaži oblik stresa za biljke na kojima su one sposobne da funkcionišu normalno, dok visoke koncentracije soli predstavljaju intenzivniji stres, koji dovodi do oštećenja ćelijskih struktura, pa je razviće novih kauloida i filoida onemogućeno (Bogdanović *et al.* 2011). Osim toga, energija će se preusmeriti na preživljavanje, a ne na rastenje i razviće. Ove tvrdnje su potkrepljene i prethodnim istraživanjima na briofitama (Vujičić 2016).

Na osnovu rezultata dobijenih za prečnik sekundarne protoneme (grafik 4) uočava se da je trend smanjenja prečnika sličan trendu smanjenja indeksa multiplikacije za sve tri ispitivane vrste. Visoke koncentracije NaCl deluju inhibitorno na formiranje sekundarne protoneme. Vrsta *P. patens* najslabije razvija protonemu kada se gaji na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl, dok sa druge strane, pokazuje visoku sposobnost formiranja novih izdanaka. Za razliku od nje, brio-halofita *H. heimii* intenzivno razvija sekundarnu protonemu kada se gaji na hranljivoj podlozi sa dodatkom visokih koncentracija NaCl, dok je njen IM nešto niži. Za vrstu *E. hungaricus* zabeležene su visoke vrednosti oba merena morfo-genetska parametra (IM i prečnik sekundarne protoneme), što ukazuje na veoma dobru prilagođenost ove vrste na uslove povećane koncentracije soli u podlozi.

S obzirom na to da je određen broj jedinki preživeo i pored smanjene sposobnosti formiranja novih izdanaka i sekundarne protoneme, može se zaključiti da koncentracije NaCl koišćene u ovom eksperimentu nemaju u potpunosti inhibitorni efekat na rastenje i razviće ispitivanih briofita. Stepem smanjenja rasteња i razvića generalno zavisi od mnogobrojnih faktora, kao što su koncentracija soli,

vrsta soli, dužina trajanja izlaganja biljaka solima i od genotipa vrste (Parida & Das 2005; Munns & Tester 2008). Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji ukazuju na strategiju razvića koju određena ispitivana vrsta koristi u uslovima stresa. Nehalofitna mahovina *P. patens* dobro toleriše visoke koncentracije soli, a energiju ulaže više u formiranje većeg broja krupnijih pupoljaka, dok halofite više koriste strategiju kolonizacije supstrata putem razvića sekundarne protoneme. U ovom slučaju, *E. hungaricus* je sličniji drugoj brio-halofiti *H. heimii*, dok je u slučaju formiranja novih pupoljaka sličniji *P. patens*. Od svih ispitivanih vrsta, *H. heimii* ima najintezivnije razvijenu protonemu, što se može zapaziti i na slikama 18 i 19. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti se da povećanje koncentracije NaCl inhibitorno deluje na formiranje protoneme kod svih ispitivanih vrsta.

Povećana koncentracija NaCl generalno dovodi do smanjenja prosečnog broja novoformiranih pupoljaka, odnosno, do smanjenog razvoja kauloida, filoida i bočnih grana kod mahovina. Rezultati u ovoj disertaciji su u saglasju sa rezultatima dobijenim u prethodnim istraživanjima na istim vrstama mahovina (Vujičić 2016). Pokazano je da niske koncentracije NaCl (5 i 10 mM) stimulišu formiranje novih pupoljaka kod halofitnih vrsta mahovina *E. hungaricus* i *H. heimii* (Vujičić 2016). Međutim, nije iznenađujuć rezultat da na ekstremnim koncentracijama soli brio-halofite ne formiraju nove pupoljke, jer se na visokim koncentracijama NaCl energija verovatno ulaže u sintezu protektivnih jedinjenja, prvenstveno jedinjenja za antioksidativnu zaštitu i osmotsko prilagođavanje. Može se pretpostaviti da se u takvim situacijama zaustavlja ćelijska deoba i izduživanje ćelija kod biljaka, a stimuliše povećana aktivnost enzimske, ali i neenzimske komponente antioksidativne zaštite, koje imaju važnu ulogu u odgovoru na stres.

Iako je uticaj različitih koncentracija soli na morfogenezu mahovina istraživana oblast (Vujičić 2016; Ćosić *et al.* 2019), manje se zna o uticaju ABA na fiziološke procese prilikom stresa izazvanog solima kod briofita. Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj disertaciji, uočava se da je usled primene 50  $\mu$ M ABA 72h pre pasaziranja biljaka na hranljivu podlogu sa dodatkom NaCl, preživljavanje maksimalno (100%) za sve tri ispitivane vrste, što nije slučaj kada odsustvuje predtretman sa ABA. Na osnovu toga se može zaključiti da egzogeno dodata ABA utiče na povećanje sposobnosti preživljavanja nepovoljnih uslova. Sa druge strane, ABA dovodi do smanjenja dužine i broja novih izdanaka, što se jasno može videti na slikama 18 i 19. Biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA odlikuje niži rast, sitniji filoidi i kauloidi braonkaste boje, što je u određenoj meri očekivano, s obzirom na to da ABA jeste hormon koji uopšteno deluje kao inhibitor razvojnih procesa. Biljke koje se nakon gajenja na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA prebacuju na hranljivu podlogu sa dodatkom NaCl ne pokazuju značajnu promenu u IM i morfologiji (grafik 2). Egzogeno ABA inhibira formiranje novih izdanaka i usporava proces izduživanja izdanaka. Međutim, evidentno je da, ukoliko se primeni kao predtretman, ABA utiče na povećanje tolerancije na stres izazvan solima i ne dovodi do drastičnih promene na nivou morfologije i anatomije.

Prema dostupnim podacima u literaturi poznato je da egzogeno ABA dovodi do inhibicije rasteња i razvića protoneme i formiranja novih izdanaka kod svih do sada ispitivanih vrsta mahovina (Ćosić *et al.* 2019). Naime, ABA inhibira diferencijaciju kauloneme i pojavu pupoljaka koji prelaze u gametofore tako što se suprosvavlja delovanju citokina, koji podstiče formiranje pupoljaka kod mahovina (Chopra & Kapur 1989; Christianson 2000). Osim toga, ABA inhibira i formiranje gametangija, ali zato podstiče formiranje struktura za vegetativno razmnožavanje (Chopra & Mehta 1987), kao što su geme (Hartung *et al.* 1994) i brahicite (Chopra & Kapur 1989; Goode *et al.* 1993; Decker *et al.* 2006). Formiranje brahicita je proces zavisen od delovanja ABA i zavisi od koncentracije ABA i trajanja tretmana (Minami *et al.* 2005). Međutim, pokazano je da i visoke koncentracije NaCl utiču na formiranje velikog broja brahicita i tmema ćelija kod *P. patens* nakon dve nedelje gajenja na podlozi sa dodatkom 100  $\mu$ M ABA (Arif *et al.* 2019). U eksperimentalnim istraživanjima u ovoj



disertaciji, vrsta *P. patens* nije formirala brahicite nakon 72h gajenja na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA, dok su brio-halofite *E. hungaricus* i *H. heimii* formirale značajan broj vegetativnih dijaspora (slika 21). Brahicite su okrugle ćelije zadebljelih ćelijskih zidova, sa malim vakuolama, bogate lipidima i skrobom. Međutim, veoma su varijabilne i morfologija im zavisi od vrste briofita kod koje se razvijaju. Iz brahicita se razvijaju hloronemalni filamenti kada se biljke pasažiraju na hranljivu podlogu bez dodatka ABA (Mallón *et al.* 2006), što ukazuje da sa nastankom povoljnih uslova briofite tretirane ABA mogu oporaviti i nastaviti da rastu i razvijaju se normalno. Kod vrste *H. heimii* zapaženo je intenzivno formiranje tmema ćelija, odnosno, specijalizovanih ćelija koje služe za fragmentaciju protoneme i potencijalno za vegetativno razmnožavanje (Slika 21, c3, c4). One nastaju kada dolazi do apoptoze unutar pojedinih ćelija protoneme, čime se omogućava propagacija delova protoneme i/ili brahicita, pored kojih se tmeme često formiraju (Bopp *et al.* 1991). Iako su brahicite specifične za vrstu, u literaturi postoje podaci o sličnosti procesa formiranja brahicita između vrsta *F. hygrometrica* i *P. patens* (Arif *et al.* 2019). Generalno se u eksperimentima formiranje brahicita indukuje primenom ABA u opsegu od 25-100  $\mu\text{M}$  (Richardt *et al.* 2010). Formiranje tmema i brahicita je energetski zahtevan proces, ali je ovo veoma efikasna strategija koja omogućava briofitama preživljavanje ekstremnih uslova na staništu (brahicite), odnosno potencijalno dospevanje vegetativnih delova talusa na staništa sa optimalnijim uslovima (omogućeno formiranjem tmema, kojima se fragmentiše protonema).

Morfološke promene koje nastaju usled delovanja ABA kod briofita zavise od primenjene koncentracije ABA i od dužine trajanja izlaganja biljaka egzogenom dejstvu ABA (Vujičić *et al.* 2016). Pokazano je da nakon 4 nedelje gajenja vrste *P. patens* na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA dolazi do formiranja velikog broja novih izdanaka i pupoljaka ukoliko je ABA dodata u niskim koncentracijama (0,03 – 0,1  $\mu\text{M}$ ). Sa druge strane, visoke koncentracije ABA u hranljivoj podlozi (preko 1  $\mu\text{M}$ ) utiču na značajno smanjenje IM. Razviće sekundarne protoneme je inhibirano kod vrsta *P. patens* i *A. undulatum* dodatkom ABA u hranljivu podlogu (Vujičić *et al.* 2016). Međutim, ukoliko se biljke gaje na podlozi sa dodatkom ABA i NaCl, protonema se relativno dobro razvija, što ukazuje da interakcija NaCl i ABA dovodi do takvih morfogenetskih promena, koje mogu povećati toleranciju na stres izazvan NaCl.

Dokumentovano je da ABA kao hormon podstiče toleranciju na abiotički stres (Sakata *et al.* 2014). Ukoliko se biljke gaje na podlozi sa dodatkom ABA, a nakon toga izlože delovanju abiotičkog stresa, dolazi do povećanja tolerancije na stres koji je indukovano, kao što je primećeno tokom stresa izazvanog niskim temperaturama (Minami *et al.* 2003) i desikacije (Werner *et al.* 1991). Kod model vrste *P. patens* egzogena ABA povećava toleranciju na sušu, niske temperature i osmotski stres (Minami *et al.* 2003; Marella *et al.* 2006; Nagao *et al.* 2006; Cuming *et al.* 2007; Khandelwal *et al.* 2010; Wang *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2018) i dovodi do mnogobrojnih promena na morfološkom nivou koje potencijalno povećavaju preživljavnje stresnih uslova. Međutim, mehanizma na koji ABA i NaCl interaguje je verovatno složen i nepoznat. Ono što je poznato je da se primenom ovih jedinjenja aktivira ekspresija gena koji dovode do odgovora koji omogućava toleranciju na stres kod svih do sada ispitanih vrsta briofita (Wang *et al.* 2008).

## 5.2. Spektrofotometrijska analiza fotosintetičkih pigmenata

Hlorofili su glavni fotosintetički pigmenti i određivanje njihove koncentracije kod biljaka gajenih u stresnim uslovima je dobar indikator fotosintetske aktivnosti (XinWen *et al.* 2008). Proces fotosinteze je veoma osetljiv na stres izazvan solima, budući da joni uzrokuju oštećenja tilakoidnih membrana, inaktiviraju enzime, utiču na degradaciju hlorofila i dovode do disrupcije elektron-transportnog lanca (Lu & Vonshak 1999). Kao jedan od parametara koji se koristi za procenu

tolerancije neke vrste na stres izazvan solima je retencija hlorofila (Rajesh *et al.* 1998; Parida & Das, 2005). Smanjenje sadržaja ukupnih hlorofila tokom stresa izazvanog solima je uobičajena pojava i u različitim istraživanjima koncentracija hlorofila se koristi kao indikator stanja metabolizma (Chutipaijit *et al.* 2011). Generalno se smatra da je smanjenje koncentracije fotosintetičkih pigmenata karakteristično za vrste osetljive na stres (Delfine *et al.* 1999) i zavisi od koncentracije soli, trajanja tretmana i biljne vrste koja se izlaže stresu. Sa druge strane, kod vrsta tolerantnih na stres izazvan solima, sadržaj hlorofila se ne menja drastično ili se u određenim slučajevima zapaža povećanje koncentracije hlorofila usled povećanja saliniteta (Mišić *et al.* 2009). Inhibicija fotosinteze koja nastaje usled delovanja soli eventualno je reverzibilna ukoliko se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa nižom koncentracijom soli ili ukoliko stres ne traje duži vremenski period. U slučaju da se biljke razvijaju u uslovima dugotrajnog stresa izazvanog solima, dolazi do ireverzibilnih oštećenja fotosintetičkog aparata, kao i redukcije aktivnosti enzima, posebno Rubisco (Delfine *et al.* 1999).

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji potvrđuju činjenicu da promena koncentracije fotosintetičkih pigmenata zavisi od ispitivane vrste, kao i od koncentracije NaCl dodavane u hranljivu podlogu na kojoj su biljke gajene. Kod sve tri ispitivane vrste briofita zapaža se smanjenje koncentracije ukupnih hlorofila usled povećanja koncentracije NaCl u hranljivoj podlozi (grafik 5). Ovakav rezultat je očekivan, s obzirom na to da dostupni literaturni podaci ukazuju da dugotrajni stres izazvan solima dovodi do smanjenja fotosintetičkih pigmenata kod mahovina, dok kratkotrajni stres u trajanju od 3 dana nema uticaj na smanjenje koncentracije ukupnih hlorofila (Vujičić 2016). Halofitne vrste mahovina *H. heimii* i *E. hungaricus* gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom visokih koncentracija NaCl (250 i 500 mM) imaju statistički značajnu veću koncentraciju ukupnih hlorofila u poređenju sa nehalofitnom mahovinom *P. patens* u istim uslovima, što ukazuje da su brio-halofite tolerantnije na stres izazvan solima.

Kod biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom 500 mM NaCl, moguće je izmeriti određenu koncentraciju pigmenata, što ukazuje na prisustvo pigmenata kod sve tri ispitivane vrste i u ovako ekstremnim uslovima, a što je u korelaciji sa rezultatima dobijenim za preživljavanje (tabela 1). Dobijeni rezultati su osnova za pretpostavku da se sa uspostavljanjem optimalnih uslova (kada se biljke pasażiraju na hranljivi medijum bez dodatka NaCl) kod ovih vrsta potencijalno mogu obnoviti komponente fotosintetičkog aparata i dalje nesmetano vršiti proces fotosinteze.

Povećane koncentracije NaCl nepovoljno deluju na ispitivane mahovine inhibirajući i/ili usporavajući morfogenetske i fiziološke procese, ali one nužno ne dovode do njihovog potpunog prestanka (Vujičić 2016). Ova činjenica je potvrđena kod vrsta *A. undulatum* i *B. argenteum* u pogledu procesa fotosinteze, koje su usled gajenja na hranljivim podlogama sa dodatkom visoke koncentracije NaCl zadržale određenu količinu hlorofila i u značajnoj meri preživele (Bogdanović *et al.* 2011). Pored toga, pokazano je da i vrsta *P. patens* uspešno preživljava i da se oporavlja nakon gajenja na podlozi sa dodatkom 500 mM NaCl i da u tom slučaju ne dolazi do kompletne degradacije hlorofila, već samo do njegove usporene sinteze (Frank *et al.* 2005).

Odnos hlorofila a/b je kod briofita nešto niži (oko 2:1) u odnosu na vaskularne biljke (3:1). Svako odstupanje od navedenog odnosa može biti rezultat delovanja nekog stresogenog faktora, u ovom slučaju NaCl. Smanjenje odnosa hlorofila a i b može biti uslovljeno oksidativnim stresom, koji dovodi do degradacije hlorofila, prvenstveno hlorofila a (Singh & Dubey 1995), ali i dehidratacijom koja utiče na smanjenu sintezu hlorofila i promene u tilakoidnim membranama (Khaleghi *et al.* 2012). Na osnovu rezultata dobijenih i prikazanih u ovoj disertaciji (grafik 7) uočava se povećanje odnosa hlorofila a i b u odnosu na kontrolu kod vrste *H. heimii* usled delovanja 500 mM NaCl. Ovakav rezultat je posledica neznatnog povećanja koncentracije ukupnih hlorofila, kao i hlorofila a i b. Međutim,

povećanje odnosa hlorofila a i b nije značajno usled stresa izazvnog NaCl, iako je takav trend zabeležen kod nekih biljaka (Gomes *et al.* 2011). Uopšteno, negativan efekat NaCl na koncentraciju ukupnih hlorofila pokazan je u okviru različitih istraživanja na vaskularnim biljkama (Jungklang *et al.* 2003; Gomes *et al.* 2011; Miladinova *et al.* 2013) kao i kod pojedinih vrsta briofita (Frank *et al.* 2005; Chaves *et al.* 2009; Bogdanović *et al.* 2011).

Egzogena ABA i NaCl utiču na smanjenje sadržaja hlorofila a, b i karotenoida kod mahovina (Vujičić *et al.* 2016; Vujičić 2016). Ukoliko se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA, uočavaju se promene u odnosu hlorofila a i b, koje su specifične za svaku pojedinačnu ispitivanu vrstu. Opšti zaključak je da je odnos hlorofila a i b neznatno viši u eksperimentu II (grafik 8), što ukazuje da egzogena ABA utiče na sintezu i/ili očuvanju hlorofila. Međutim, kod vrste *P. patens* gajene na podlozi sa dodatkom ABA, dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih hlorofila, što je i očekivano (grafik 6). Poznato je da egzogena ABA utiče na smanjenje koncentracije fotosintetičkih pigmenata kod vrsta *M. polymorpha* i *A. undulatum* (Vujičić 2016; Vujičić *et al.* 2016). Sa druge strane, kod brio-halofite *H. hemii* gajene na podlozi sa dodatkom ABA dolazi do povećanja koncentracije ukupnih hlorofila, dok kod vrste *E. hungaricus* nema uočljivih promena (grafik 6).

Relativno visoke koncentracije ukupnih hlorofila su izmerene kod biljaka vrste *P. patens* koje su gajene na podlogama sa dodatkom niskih ili umerenih koncentracija NaCl i dodatkom ABA. Može se pretpostaviti da je egzogena ABA podstakla sintezu hlorofila kod biljaka koje su izložene uticaju niskih koncentracija NaCl. Sa druge strane, halofite održavaju stabilne vrednosti koncentracije ukupnih hlorofila na svim tretmanima.

Karotenoidi su značajna zaštitna komponenta biljaka, čija se sinteza aktivira tokom stresa, što je utvrđeno na osnovu rezultata prikazanih u ovoj disertaciji (grafik 9). Zapaženo je da kod vrsta tolerantnih na stres izazvan NaCl dolazi do povećanja koncentracije ukupnih karotenoida. U uslovima kontrolisanog intenziteta zračenja (osvetljenosti) to može biti jedan od mehanizama tolerancije i odbrane i od stresa izazvanog solima. Ipak, ukoliko nema povećanja koncentracije ukupnih karotenoida, to ne mora da znači da je vrsta osetljiva na povišen salinitet, već je moguće da takve vrste poseduju neke druge mehanizme tolerancije i adaptacije na stres.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji može se zaključiti da niske koncentracije NaCl stimulišu sintezu karotenoida kod sve tri ispitivane vrste (grafik 9). Porast u koncentraciji ukupnih karotenoida je posebno izražen kod biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom 10 i 50 mM (vrste *P. patens* i *E. hungaricus*), dok je kod vrste *H. heimii* visoka koncentracija ukupnih karotenoida primetna i na višim koncentracijama NaCl (100 i 250 mM). Ovakvi rezultati su u suprotnosti sa rezultatima dobijenih od strane Vujičić-a (2016), gde niske koncentracije soli u podlozi ne dovode do značajnog povećanja koncentracije ukupnih karotenoida kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii*. Pored toga, rezultati dobijeni ispitivanjem vaskularnih biljaka ukazuju da stres izazvan solima inhibira sintezu svih fotosintetičkih pigmenata, pa i karotenoida i tako dovodi do smanjenja koncentracije ukupnih fotosintetičkih pigmenata (Khan 2003; Gomes *et al.* 2011). Sharma & Hall (1991) ukazuju da stres izazvan solima indukuje degradaciju  $\beta$ -karotena, što uzrokuje smanjenje sadržaja karotenoida u tilakoidnim membranama. Na osnovu toga može se reći da smanjena sinteza karotenoida dovodi do smanjene zaštite fotosintetičkog aparata, a time i ka degradaciji hlorofila (Lima *et al.* 2004). Sinteza karotenoida je zahtevan proces po pitanju ulaganja energije u odnosu na sintezu hlorofila, pa se često na niskim koncentracijama soli ne uočava porast koncentracije karotenoida (Amirjani 2011).

Međutim, iako je sinteza karotenoida proces koji je energetski zahtevniji u odnosu na sintezu hlorofila, oni su glavna zaštita hlorofila od fotooksidacije, pa biljke prilikom umerenog stresa ili stresa

koji ne traje dugo, potencijalno ulažu više energije u zaštitu hloroplasta i očuvanje fotosintetičkog aparata nego u samu sintezu hlorofila. Pored toga, niske koncentracije NaCl utiču na povećanje koncentracije fotosintetičkih pigmenata kod sve tri ispitivane vrste, što ukazuje na to da su ove vrste veoma tolerantne na stres solima i da se kod njih fotosinteza odvija neometano. Generalno, na niskim koncentracijama soli nema značajne promene u količini karotenoida, dok se na visokim koncentracijama soli indukuje sinteza karotenoida, verovatno zbog njihovog učešća u ksantofilnom ciklusu (Borghesi *et al.* 2011).

Poznato je da su karotenoidi uključeni u odgovor biljaka na stres izazvan solima i da ABA utiče na njihovu sintezu, kao i to da je osetljivost biljaka na egzogeno dodatu ABA *species* - specifičan (Ćosić *et al.* 2019). U ovoj disertaciji egzogena ABA na neki način inhibira sintezu karotenoida. Koncentracija ukupnih karotenoida višestruko opada kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA (grafik 10). Ovakav rezultat je u korelaciji sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji za parametre morfogeneze i ukupne hlorofile, što ukazuje na inhibitorski efekat ABA koji je veoma dobro poznat. Pored toga, u literaturi su dostupni podaci koji govore o tome da egzogena primena ABA kod mahovina dovodi do smanjenja sadržaja karotenoida (Ćosić *et al.* 2018). Generalno su koncentracije fotosintetičkih pigmenata dosta niže u eksperimentu II (usled delovanja ABA) nego u eksperimentu I. Međutim, biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i potom pasažirane na hranljivu podlogu sa dodatkom NaCl, ne pokazuju drastične promene u koncentraciji ukupnih karotenoida. Trend koji se uočava na grafiku 10, je sličan trendu dobijenom u eksperimentu I za vrstu *P. patens* (grafik 9), što može ukazivati da ona veoma dobro reaguje na egzogeno dodatu ABA. Kod brio-halofitih vrsta, ABA dovodi do znatnog smanjenja koncentracije ukupnih karotenoida. Međutim, usled prisustva NaCl u hranljivoj podlozi (50 i 100 mM) uočava se porast u koncentraciji karotenoida kod vrsta *E. hungaricus* (na 50 mM) i *H. heimii* (na 100 mM). Poznato je da se prilikom vodnog deficita, osmotskog stresa i stresa izazvanog solima povećava količina endogene ABA (Minami *et al.* 2005), kao i to da su prekursori za njenu sintezu karotenoidi. Upravo ovaj zajednički put u biosintezi ABA i karotenoida može biti objašnjenje za povećanje karotenoida na većim koncentracijama soli kod biljaka tretiranih ABA. Egzogena ABA štiti fotosistem II kod *A. undulatum* (Beckett *et al.* 2000) i *S. angustifolium* tokom desikacije (Marschall & Borbely 2011). Međutim, drugačiji rezultati su dobijeni u eksperimentima sa vrstom *A. androgynum*, kod koje ABA nije podstakla zaštitu hlorofila tokom desikacije (Mayaba *et al.* 2001).

Razlika u koncentraciji fotosintetičkih pigmenata između vrsta ukazuje na razlike u odgovoru ispitivanih vrsta na iste ili slične uslove u kojima se nalaze, a potencijalno na različite mehanizme odbrane od stresa izazvanog NaCl koje one koriste.

### **5.3. Analiza fenolnih jedinjenja i terpenoida**

Veliki broj do sada ispitivanih jedinjenja odlikuje izrazita biološka aktivnost, a posebno aktivnost u održavanju redoks homeostaze. Briofite generalno imaju veliki diverzitet hemijskih jedinjenja i upravo ta hemijska raznovrsnost im omogućava jak odbrambeni mehanizam za preživljavanje različitih nepovoljnih uslova na staništu. Veoma su bogate sekundarnim (specijalizovanim) metabolitima kao što su terpenoidi, flavonoidi, alkaloidi, glikozidi, saponini, antrakinoni, steroli i druga aromatična jedinjenja (Gathori & Chaturvedi 2018).

#### **5.3.1. Fenolna jedinjenja**

Fenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji se odlikuju značajnim diverzitetom i velikom raznovrsnošću jedinjenja - sadrže preko 9000 različitih jedinjenja (Waśkiewicz *et al.* 2013). Ispoljavaju

značajna fiziološko-hemijska i biološka svojstva, a sintetišu se putem šikiminske kiseline ili od fenilpropanoida. Njihova sinteza se aktivira endogeno u toku razvića, ali može biti pokrenuta i različitim egzogenim faktorima, kao što su stresogeni faktori (Crozier *et al.* 2006). Kod biljaka igraju ulogu kao signalni molekuli, zaštita od UV zračenja i patogena, privlačenju oprašivača, stimulaciji rezistencije na bolesti i/ili zaštiti od oksidativnog stresa. Fenoli se generalno dele u 4 glavne klase: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (Rice-Evans *et al.* 1996; Joganath & Crozier 2010).

Fenolne kiseline su veoma zastupljena klasa fenolnih jedinjenja i mogu se javiti kao solubilna forma konjugovani sa šećerima i organskim kiselinama, ali i u složenim strukturama tanina ili lignana (Jaganath & Crozier 2010). Flavonoidi su glavna grupa polifenola identifikovana kod biljaka i dele se u nekoliko klasa: flavoni, izoflavoni, flavonoli, flavanoni, flavan-3-oli, flavan-3,4-dioli i antocijanini (Waśkiewicz *et al.* 2013). Drugi flavonoidi su manje zastupljeni i tu spadaju halkoni, dihidrohalkoni, auron, kumarini i dihidroflavonoli. U ovoj disertaciji su vršene analize fenolnih kiselina, flavonoida, flavonola i kumarina.

Fenolna jedinjenja predstavljaju neenzimsku komponentu antioksidativnog sistema zaštite kod biljaka, koji se aktivira kao odgovor na oksidativni stres, koji sekundarno nastaje kao posledica delovanja povećanih koncentracija NaCl na biljke. Antioksidativna svojstva fenola, posebno flavonoida, se upravo pripisuju njihovoj sposobnosti da doniraju H<sup>+</sup> ili elektrone antioksidativnim enzimima i da na taj način deluju kao „skevendžeri” slobodnih radikala (Rice-Evans *et al.* 1996). Vakuolarne peroksidaze mogu da redukuju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koristeći fenole kao primarne donore elektrona (Sgherri *et al.* 2003). Eksperimenti u *in vitro* uslovima su pokazali da polifenoli imaju veću antioksidativnu aktivnost od askorbata i tokoferola kod biljaka, upravo zbog svoje sposobnosti da doniraju H<sup>+</sup> ili elektrone enzimima (Das & Roychoudhury 2014). Polifenoli mogu da heliraju tranzicione jone metala i direktno uklanjaju ROS i inhibiraju lipidnu peroksidaciju „hvatanjem“ lipidnog alkoksilnog radikala. Takođe modifikuju redosled pakovanja lipida i smanjuju fluidnost membrane (Arora *et al.* 2000). Flavonoidi i fenilpropanoidi se oksiduju od strane peroksidaze i učestvuju u uklanjanju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kod mahovine *Brachythecium velutinum* i jetrenjače *M. polymorpha* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se uklanja putem askorbat glutationskog sistema uz učešće APX (Paciolla & Tommasi 2003).

Prema dosadašnjim podacima, povećan salinitet može uticati i na povećanje, ali i na smanjenje sadržaja ukupnih fenola kod biljaka. Posebno je izražena sinteza fenola kod biljaka gajenih na podlozi sa niskim do umerenim salinitetom, dok se kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa visokim koncentracijama NaCl može primetiti znatni pad sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (Navarro *et al.* 2006; Rezazadeh *et al.* 2012). Kratkotrajni stres izazvan visokim koncentracijama NaCl (1000 mM) utiče na značajno smanjenje fenolnih jedinjenja kod vaskularnih biljaka, dok dugotrajni stres izazvan niskim ili umerenim koncentracijama NaCl (do 200 mM) ne utiče na promenu koncentracije ukupnih fenola (Kim *et al.* 2008). Mnogobrojna istraživanja na vaskularnim biljkama ukazuju da se koncentracija ukupnih fenola uobičajeno menja tokom stresa izazvanog solima, raste ili opada, a da navedene promene zavise od biljne vrste, dužine trajanja tretmana, koncentracije NaCl, faze razvoja i perioda u kom se vrši merenje (Kim *et al.* 2008; Yuan *et al.* 2010; Waśkiewicz *et al.* 2013). Isti podaci su dobijeni u istraživanjima kod briofita, odnosno, stres izazvan NaCl-om može uticati i na povećanje i na smanjenje sadržaja ukupnih fenola, kao što je pokazano na vrstama *B. argenteum* i *A. undulatum* (Bogdanović *et al.* 2011). U eksperimentima u kojim su kao objekti korišćene vrste *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* pokazano je da dugotrajni stres izazvan NaCl utiče na povećanje količine fenolnih jedinjenja u ispitivanim biljnim vrstama, u odnosu na kratkotrajni stres izazvan sa NaCl (Vujičić 2016).



Briofite odlikuje veliki hemodiverzitet, posebno fenolnih jedinjenja. Iako su fenolna jedinjenja dosta ispitivana kod briofita u pogledu hemijskog sastava, manje je poznata njihova konkretna funkcija (Chobot *et al.* 2006; Asakawa *et al.* 2009).

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju može se uočiti da je u kontrolnoj grupi sve tri ispitivane vrste koncentracija ukupnih fenola prilično visoka (grafik 11 i 12), ali da je kod vrste *E. hungaricus* zabeležena najveća vrednost. Rezultati sa grafika 11 idu u prilog prethodno iznetim tvrdnjama, odnosno, umerene koncentracije NaCl različito utiču na koncentraciju fenolnih jedinjenja, što znači da se fenolna jedinjenja akumuliraju ili troše *species* – specifično. Visoke koncentracije NaCl dovode do smanjenja koncentracije fenolnih jedinjenja kod sve tri ispitivane vrste i takav obrazac je generalno očekivan. U literaturi nema podataka kako egzogena ABA utiče na sadržaj fenolnih jedinjenja, ali rezultati iz ove disertacije govore o tome da ABA kod halofita utiče na smanjenje koncentracije fenola, dok kod *P. patens* nema značajne promene sadržaja fenolnih jedinjenja (grafik 12). Histoheмиjske tehnike bojenja korišćene u ovoj disertaciji su nesumnjivo pokazale postojanje fenolnih jedinjenja kod sve tri ispitivane vrste mahovina i u skladu su sa rezultatima dobijenim korišćenjem spektrofotometrijskih metoda. Pored toga što ukazuju na prisustvo/odsustvo nekog jedinjenja, histoheмиjske tehnike mogu pretpostaviti lokalizaciju jedinjenja u određenim delovima biljke, ali i kompartmanima ćelija. Fenolna jedinjenja se akumuliraju prvenstveno u citoplazmi ćelija, ali se ne može sa sigurnošću utvrditi tačna lokalizacija kod većine preparata. S obzirom na njihove hemijske karakteristike, očekivano je da se veliki broj ovih fenolnih jedinjenja skladišti u unutrašnjosti ćelija.

Ukupan sadržaj fenolnih kiselina je u skladu sa rezultatima dobijenim za ukupne fenole (grafik 13), što ukazuje da su fenolne kiseline veoma zastupljena i značajna komponenta kod ispitivanih mahovina. Egzogeno dodata ABA utiče na smanjenje sadržaja fenolnih kiselina kod sve tri ispitivane vrste. Uočava se značajno smanjenje udela fenolnih kiselina u odnosu na detektovane ukupne fenole kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA (grafik 14). Uopšteno, dobijeni rezultati za ukupne fenolne kiseline su u korelaciji sa rezultatima dobijenim za ukupne fenole za sve tri vrste što ukazuje da su fenolne kiseline značajna komponenta kod ispitivanih briofita i da aktivno doprinose odgovoru na egzogeni NaCl i ABA. Histoheмиjskim tehnikama je utvrđeno da se kod biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom ABA detektuju fenolna jedinjenja u ćelijskim zidovima ćelija filoida i protoneme. Međutim, kako je poznato da briofite ne poseduju lignin kao vaskularne biljke, već jedinjenja slična ligninu, moguće je pretpostaviti da se akumuliraju neke vrste hidroksicimetnih kiselina u ćelijskim zidovima. Za razliku od strukture lignina u ćelijskom zidu vaskularnih biljaka, kod briofita nedostaje metoksi grupa u jedinjenjima sličnim ligninu (Wallace & Fry 1994).

Prisustvo fenolnih jedinjenja u ćelijskim zidovima kod sve tri ispitivane vrste je uočeno uz pomoć navedenih tehnika i zaključeno je da se isključivo javljaju kod biljaka koje su gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA. Intenzivnije bojene reakcije i fluorescencija ukazuju da se veća količina fenola nalazi kod vrsta iz familije Funariaceae nego kod halofite *H. heimii*. Generalno se može uočiti da biljke gajene na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl akumuliraju fenole u citoplazmi ćelija protoneme, a prilikom dodavanja visokih koncentracija NaCl (250 mM) i u citoplazmi ćelija filoida, što je pokazatelj velikog značaja ove grupe jedinjenja u odbrani biljaka od stresa izazvanog NaCl. Sa druge strane, predtretman ABA uslovljava nešto manje intenzivnu akumulaciju fenolnih jedinjenja, a koji se pretežno akumuliraju u ćelijskom zidu filoida i protoneme. Moguće je da u ovakvim uslovima dolazi do povećanje koncentracije određenih fenolnih jedinjenja koja ulaze u sastav ćelijskog zida kao što su hidroksicimetne kiseline (Wallace & Fry 1994). Poznato je da je lignin fenolni polimer p-kumaril alkohola, konferil alkohola i siringil alkohola, čija sinteza potiče od šikiminske kiseline. Prva fenolna

kiselina koja se formira je p-CA, pa ferulična, pa CA, stoga nije čudno što se u velikoj količini mogu sresti ovi tipovi fenola u ćelijskim zidovima.

Na osnovu dobijenim rezultata HPLC metodom (grafik 21) potvrđeno je prisustvo fenolnih kiselina kod sve tri ispitivane vrste. Najzastupljenije fenolne kiseline kod vrste je *P. patens* su CA i p-CA, čije se koncentracija povećava u ekstraktu ukoliko se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl (grafik 21 A). U literaturi je poznato da su CA i hlorogena kiselina jedne od najzastupljenijih fenolnih jedinjenja kod *P. patens* (Erxleben *et al.* 2012). Međutim, one su detektovane samo u gametoforima (Erxleben *et al.* 2012). Kod halofite *E. hungaricus* je dominantno prisutna p-CA, čija koncentracija raste usled umerenog stresa izazvanog NaCl (grafik 21 B). Vrsta *H. heimii* sadrži samo CA od fenolnih kiselina, dok p-CA nije detektovana (grafik 21 C). Kvalitativni sastav i koncentracija pojedinačnih komponenti je karakterističan za vrstu.

Egzogena ABA utiče na povećanje koncentracije CA i p-CA kod *P. patens*, što ukazuje da ABA podstiče sintezu fenolnih kiselina kod ove vrste. Kod vrste *E. hungaricus* sadržaj fenolnih jedinjenja je nešto raznovrsniji usled delovanja ABA, ali se koncentracija fenolnih kiselina smanjuje (tabela 8). Za razliku od nje, kod halofite *H. heimii* ABA utiče na povećanje koncentracije CA (tabela 9), iako je koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja kod ove vrste je generalno niska. Zanimljivo je da ni u eksperimentu II nije detektovana p-CA kod *H. heimii*, koja je dominantno zastupljena kod vrsta iz familije Funariaceae.

Moguće je pretpostaviti iz dobijenih rezultata u ovoj disertaciji da se vrši akumulacija ili depozicija p-CA i CA u ćelijske zidove kod ispitivanih vrsta mahovina gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA. Njihovo prisustvo je detektovano i kod vrsta gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl, bez predtretmana, ali histohemijske tehnike ne govore o njihovoj lokalizaciji u ćelijskom zidu, već isključivo u citoplazmi. Moguće je da, iako se detektuje njihova povećana sinteza usled egzogenog dodavanja NaCl, njihovo prisustvo u ćelijskom zidu ne detektuje histohemijski, jer dolazi do njihovog trošenja od strane antioksidativnih enzima. Poznato da je u ćelijskom zidu može doći do autooksidacije fenolnih jedinjenja u cilju stvaranja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Veljović-Jovanović *et al.* 2005; Kukavica *et al.* 2009). Pretpostavka je da ABA podstiče sintezu fenola koji se pretežno akumuliraju u ćelijski zid, kao zaštita od ulaska soli u ćeliju ili kao depo fenola za korišćenje od strane antioksidativnih enzima koji se nalaze u ćelijskom zidu. Najveća akumulacija fenola se dešava kod biljaka gajenih na podlozi sa najvećom koncentracijom NaCl, pa je to možda jedan od mehanizama koji se koristi da se biljke zaštite na ćelijskom nivou kada je stres intenzivan. Sa druge strane, zbog svojih zaštitinih svojstava, moguća je akumulacija i flavonoida kao što je slučaj kod vrste *H. heimii*, kod koje se ne uočava prisustvo hidrosicimetnih kiselina u većoj meri, već Ka.

Na osnovu rezultata dobijenih za ukupne flavonoide (Grafik 15 i 16), generalno se može zapaziti da su flavonoidi značajna komponenta fenolnih jedinjenja, koja se u velikoj količini nalazi kod sve tri ispitivane vrste mahovina, kao i to da učestvuju u odgovoru na stres izazvan sa NaCl. Rezultati dobijeni za flavonoide su generalno u korelaciji sa rezultatima dobijenim za ukupne fenole. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl ukupni flavonoidi opadaju sa porastom koncentracije NaCl, što ukazuje na njihovo trošenje/aktivnost tokom stresa. Egzogena ABA generalno utiče na smanjenje sadržaja ukupnih flavonoida kod sve tri vrste, ali su koncentracije flavonoida veoma visoke, što ukazuje da je ovo jedna od najzastupljenijih neenzimskih komponenti. Izuzetno, kod biljaka vrste *E. hungaricus* gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl nije bilo moguće detektovati flavonoide, verovatno zbog toga što se u ovom slučaju upravo flavonoidi koriste u odbrani biljaka od stresa izazvanog NaCl.

Flavonoidi su široko rasprostranjeni kod mahovina, jetrenjača i vaskularnih biljaka (Yonekura-Sakakibara *et al.* 2019). Do danas nisu identifikovani kod rožnjača (Horn *et al.* 2021). Glavne klase flavonoida kod briofita su flavoni, flavonoli, izoflavonoidi, auron, 3-deoksiksantocijanini, antocijanini i auronidini, specifični za jetrenjače (Berland *et al.* 2019). Poznato je da biljke sintetišu flavonoide i fenolne kiseline u odgovoru na UVB zračenje, koji se uglavnom akumuliraju u epidermalnim ćelijama kako bi štatile fotosintetička tkiva. Kod jetrenjače *Plagiochila asplenoides* su identifikovani derivati Ap i Lu, kao i dve hidroksicimetne kiseline (p-CA i ferulična) koji se akumuliraju usled izloženosti biljaka UV zračenju (Waterman *et al.* 2017; Soriano *et al.* 2018). Međutim, u literaturi je poznato da se fenolna jedinjenja akumuliraju i prilikom vodnog deficita (Kirakosyan *et al.* 2004; Peters *et al.* 2019) i povećanih koncentracija soli u podlozi. Efikasnost antioksidativne aktivnosti veoma zavisi od strukture polifenola, prvenstveno broja i položaja –OH veza (Rice-Evans *et al.* 1996) i pH (Lemańska *et al.* 2001; Borkowski *et al.* 2005; Muzolf *et al.* 2008). Flavonoidi imaju ulogu u uklanjanju  $^1O_2$  i ublažuju oštećenja u spoljašnjoj ovojnici hloroplasta (Agati *et al.* 2012).

Uobičajeni flavonoidi su Lu i Ap kod briofita i njihovi derivati (Asakawa *et al.* 2013). U okviru polifenola, najbolje su proučeni flavonoidi i flavonoidni glikozidi (Asakawa *et al.* 2013). Najčešće detektovani flavonoidi kod briofita su Ap, Na, Lu i 2,3-dehidroluteolin (Xiaowei 2007), ali se 5'3'''-dihidroksiametoflavon i 5'3'''-dihidroksirobustaflavon mogu naći. Zanimljivo je da su skoro svi identifikovani bisflavonoidi isključivo nađeni kod briofita (Asakawa *et al.* 2013). Moguće je identifikovati *species* - specifične sekundarne metabolite kao što su sfagnorubini i ohioenzini kod vrsta roda *Sphagnum* i *Polytrichum* respektivno (Xiaowei 2007).

Rezultati za ukupne flavonole (grafici 17 i 18) su u korelaciji sa rezultatima za ukupne flavonoide, što je i očekivano, s obzirom na to da su jedna od najbrojnijih grupa fenolnih jedinjenja kod biljaka. Na osnovu dobijenih rezultata možemo pretpostaviti da su flavonoli među najzastupljenijom komponentom u okviru flavonoida i da igraju bitnu ulogu kod ispitivanih vrsta briofita. Dinamična promena u koncentraciji flavonola kod vrste *E. hungaricus* je verovatno u vezi sa aktivnim učešćem ovih jedinjenja u toleranciji na stres.

HPLC metodom je potvrđeno prisustvo flavonoida, prvenstveno flavona i flavanona u ekstraktima ispitivanih vrsta (grafik 21). U manjoj količini su identifikovani Io, Lu, Ka (flavoni) i Na Ir (flavanoni) kod vrste *P. patens*. Kod *E. hungaricus* u veoma niskim koncentracijama Na i Io. Za razliku od vrsta porodice Funariaceae koje su bogate fenolnim kiselinama, kod *H. heimii* se u velikoj količini detektuje flavon Ka. Međutim, zanimljivo je to da kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa 250 mM NaCl dolazi do značajnog porasta flavona Lu, što nije slučaj kod druge dve vrste. Egzogeno dodat NaCl u hranljivu podlogu utiče na dinamičnu promenu koncentracija flavonoida kod sve tri ispitivane vrste (tabela 5, 6 i 7), što se posebno detektuje kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl. Kod *P. patens* se najdinamičnije menja koncentracija Io, kod *E. hungaricus* Ir, dok je kod vrste *H. heimii* uočen porast Lu i Ir, koji nisu bili prisutni u kontrolnoj grupi.

U eksperimentu II, nakon dodavanja ABA moguće je detektovati flavonoide koji nisu bili prisutni u eksperimentu I (grafik 22). To nam ukazuje da ABA pozitivno utiče na sintezu i/ili akumulaciju flavonoida kod sve tri ispitivane vrste mahovina. Egzogeno ABA utiče na povećanje Ru i Na, ali na smanjenje svih ostalih detektovanih flavonoida kod *P. patens*. Egzogeno ABA utiče na smanjenje nekih flavonoida kod *E. hungaricus* (Ru, Iq, Io, Qe), a isključivo se kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i 250 mM NaCl detektuje Ap. Kod vrste *H. heimii* egzogeno ABA utiče na smanjenje raznovrsnosti flavonoida koje je moguće detektovati u ekstraktima. Ispod granice detekcije su bili Ru, Iq, Qu i Ap, koji su zastupljeni kod vrsta iz porodice Funariaceae. Generalno,

najmanja količina fenolnih jedinjenja (fenolnih kiselina i flavonoida) prisutna je kod *H. heimii*, mada je sadržaj fenola veoma raznovrstan. Vrste *P. patens* i *E. hungaricus* poseduju veliku količinu fenolnih jedinjenja, ali je sadržaj uniformniji.

Hemija briofita nije dovoljno poznata, ali se sve više istraživanja vrši u cilju sakupljanja podataka o hemodiverzitetu briofita. Generalno se flavonoidi u većoj količini nalaze kod jetrenjača nego kod mahovina. U istraživanju sa devet vrste jetrenjača detektovana su sledeća fenolna jedinjenja: galna kiselina, protokatehinska kiselina, hlorogena kiselina, CA, Rutin, ferulična kiselina, kvercetin i kamferol (Niranjan *et al.* 2014). U metanolnim ekstraktima jetrenjače *Lunularia cruciata* identifikovani su luteolin-7-O-glikozid i kvercetin (Jocković *et al.* 2008). Kod *S. magellanicum* identifikovani su CA, galna kiselina, vanilin, hlorogena kiselina, p-CA i 3,4-hidroksibenzoeva (Montenegro *et al.* 2009). Pored navedenih, evidentno je prisustvo fenola, flavonoida, saponina, tanina i glikozida kod *M. polymorpha* (Gathori & Chaturvedi 2019). Sa druge strane, mahovine su slabije istražene. Kod vrste *Brachytheciastrum velutinum* identifikovane su fenolne kiseline 4-O-kafeoilhin 5-O- kafeoilhin, CA i elaginska kiselina i flavonoidi apigenin-7-O-glukozid, luteolin i apigenin (Jocković *et al.* 2008). Kod vrste *Kindbergia praelonga* u ekstraktima su okarakterisane fenolne kiseline 4-O- kafeoilhin, 5-O- kafeoilhin, CA, p-CA, ferulična i elaginska kiselina i derivati p-CA i flavonoidi apigenin-7-O-glukozid, luteolin i apigenin i još neki neidentifikovani (Jocković *et al.* 2008).

Međutim, i u okviru mahovina postoji razlika u zasupljenosti flavonoida, a pod uticajem je ekoloških faktora. Naime, akrokarpne mahovine imaju veće koncentracije flavonoida od pleurokarpnih mahovina. Kod mahovina gajenih u senci flavonoidi su veći nego kod onih koje rastu na direktnom svetlu (Wang *et al.* 2018).

Iako su kumarini manje zastupljeni kod briofita i manje proučavani u poređenju sa drugim klasama fenolnih jedinjenja, u ovoj disertaciji su prikazani rezultati koji nesumnjivo govore o značajnoj zastupljenosti kumarina kod sve tri ispitivane vrste mahovina (grafik 19 i 20). Vrsta *E. hungaricus* je najbogatija fenolnim jedinjenjima, pa time i kumarinima. Kao i u slučaju ostalih fenolnih jedinjenja, NaCl utiče na smanjenje koncentracije ukupnih kumarina. Od sve tri ispitivane vrste, kumarini su najmanje zastupljeni kod *H. heimii*, dok ih najviše ima kod *E. hungaricus*. Slično rezultatima dobijenim za druga fenolna jedinjenja, sadržaj ukupnih kumarina znatno opada kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA. Međutim, nakon predtretmana biljke ispoljavaju *species* - specifičan obrazac promene koncentracije kumarina, odnosno, koncentracija ukupnih kumarina raste kod vrste *P. patens*, dok naglo opada kod *E. hungaricus*. Ovakva promena trenda je veoma zanimljiv rezultat, s obzirom na to da je *P. patens* nehalofitna vrsta, pa se može pretpostaviti da kumarini delimično doprinose zaštiti i preživljavanju ove vrste. Sa druge strane, kod halofita se uočava trend smanjenja koncentracije ukupnih kumarina, pa se može zaključiti da oni aktivno učestvuju u toleranciji stresa kod ovih vrsta.

### 5.3.2. Terpeni i lipidi

Terpenoidi su najveća grupa specijalizovanih metabolita kod biljaka i najproučavanija grupa u okviru lipidnih jedinjenja. Odlikuje ih veliki diverzitet hemijske strukture, pa time i funkcija. Pored tipičnih, izoprenoidnih terpenoida, kod biljaka je identifikovan veliki broj atipičnih, glikozilovanih isparljivih terpena i kompozitnih terpena (Yazaki *et al.* 2017). Terpeni se obično kod biljaka ne nalaze pojedinačno, već u sastavu eteričnih ulja, kao lako isparljiva jedinjenja, kao što su mono- i seskviterpeni. Kod vaskularnih biljaka, posebno cvetnica, intenzivno je proučavana njihova uloga i sastav, kao i primena etarskih ulja, dok se o terpenima kod briofita nešto manje zna.

Kod briofita, terpenoidna i aromatična jedinjenja pretežno su istraživana u okviru jetrenjača i obuhvataju bibenzile, di-, seskvi- i tetraterpene (Asakawa 2011; Asakawa *et al.* 2013). Razlog za veću zainteresovanost istraživača za jetrenjače leži u postojanju uljanih telašaca u njihovom talusu. Pored terpenoida jetrenjače sintetišu i akumuliraju fitosterole, masne kiseline, alkanone i/ili neolignane u značajnoj količini (Asakawa & Ludwiczuk 2018). Kod jetrenjača je opisano oko 1600 terpenoidnih jedinjenja do danas (Chen *et al.* 2018). Najraznovrsnija grupa terpena su seskviterpeni, ali kod jetrenjača su uobičajeni i mono- i diterpeni, aromatični bibenzili, bis-bibenzili i acetogenini.

Međutim, manje je poznato da li i u kojoj meri mahovine i rožnjače akumuliraju terpenoide. Kod malog broja do sada ispitivanih mahovina detektovani su mono-, seskvi- i diterpenoidi, ali njihova koncentracija kod mahovina je dosta niža od koncentracija istih jedinjenja kod jetrenjača (Ludwiczuk & Asakawa 2019). Kod mahovina se smatralo da seskviterpeni odsustvuju (Dembitsky *et al.* 1993), ali je njihovo prisustvo nesumnjivo potvrđeno, kao i prisustvo monoterpene (Asakawa *et al.* 2013; Chen *et al.* 2018). Uobičajeni terpeni detektovani kod mahovina do sada su b-citrocitral,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, limonen, kampfen i bornil acetat (Asakawa *et al.* 2013). Međutim, samo nekoliko diterpena je identifikovano kod mahovina, i to momilakton kod *H. plumaeforme* i ent-16-hidroksikauren kod *P. patens* (Hayashi *et al.* 2006). Karakteristična grupa terpena identifikovanih kod mahovina su triterpeni, prvenstveno ursan, fernal, hopan, lupan, cikloartan, fridelan, taraksan, damaran, polipodan, obtusifolan i seratan (Asakawa *et al.* 2013). Mnogi od pomenutih terpena igraju esencijalnu ulogu kod biljaka u rasteњу i razviću kao steroli, karotenoidi ili fitohormoni.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji nesumnjivo potvrđuju postojanje terpena kod sve tri ispitivane vrste, kao i njihovu vezu sa odbranom od stresa izazvanog NaCl. Na osnovu rezultata dobijenih kolorimetrijskom metodom za ukupne terpenene (grafik 23), može se uočiti da brio-halofita *H. heimii* u kontrolnoj grupi biljaka poseduje najveću koncentraciju terpena u poređenju sa vrstama *E. hungaricus* i *P. patens*. Ukoliko se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl, sadržaj ukupnih terpena se smanjuje kod vrste *H. heimii*, ukazujući da kod ove vrste terpeni mogu igrati bitnu ulogu u odbrani od stresa izazvanog NaCl. Slični rezultati su potvrđeni i histohemijskim bojenjem sa Nadi reagensom. Ustanovljeno je da se isparljivi i neisparljivi terpenoidi akumuliraju pretežno u citoplazmi hloroneme i kauloneme, što se moglo vizuelizovati kao sferične, okrugle strukture, crvenkasto-ljubičaste ili plave boje u unutrašnjosti ćelija. Veličina ovih struktura je veoma varijabilna, a može ukazivati na količinu terpena koja se akumulira i mesto koje zauzimaju u ćelijama. Za razliku od *H. heimii*, NaCl utiče na neznatno povećanje ukupnih terpena kod vrsta porodice Funariaceae. Ovoj tvrdnji idu u prilog rezultati histohemijske analize terpenoida (slika 40 i 42). Naime, bojena reakcija je intenzivnija kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl što ukazuje da ove vrste ne akumuliraju terpenoide u optimalnim uslovima, ali da su oni bitna komponenta koja se koristi u uslovima stresa izazvanog NaCl. Lokalizacija terpenoida u citoplazmi nije specifična, ali je uvek u blizini hloroplasta kod vrste *P. patens* (slika 40 i 41). Ovakav rezultat ukazuje da je sinteza jedinjenja koja se akumuliraju u ovim strukturama u vezi sa hloroplastima, odnosno da se barem neki deo biosinteze dešava u hloroplastima. Sitnije strukture se uočavaju kod vrste *E. hungaricus*, što može navoditi na pogrešan zaključak da se kod ove vrste terpeni ne sintetišu u većoj meri (slika 42 i 43). Spektrofotometrijskim analizama je utvrđeno da je ova vrsta veoma bogata u pogledu ukupnih terpenoida (grafik 23). Može se pretpostaviti da u pogledu terpena, vrste *E. hungaricus* i *P. patens* imaju potencijalno sličnu ulogu pri odbrani od visokih koncentracija NaCl, a različite u poređenju sa *H. heimii*.

Kao veoma zastupljena klasa u okviru terpenoida, u ovoj disertaciji su analizirani triterpenoidi. Pokazano je da brio-halofite poseduju značajne koncentracije triterpena u poređenju sa *P. patens*



(grafik 23). Ukoliko se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl, dolazi do neznatnog smanjenja sadržaja ukupnih triterpena, što ukazuje na njihovo učešće u metaboličkim promenama koje nastaju kod biljaka usled delovanja stresa izazvanog solima. Ukoliko je stres intenzivan, odnosno, ukoliko se biljke gaje na podlozi sa većom koncentracijom NaCl (250 mM), uočljivo je dvostruko smanjenje koncentracije ukupnih triterpena kod vrste *E. hungaricus*, iako se ukupni terpeni povećavaju. Ovakav rezultat ukazuje na potencijalnu razgradnju triterpena i ulaganje energije u sintezu i akumulaciju drugih lipofilnih jedinjenja koja se detektuju kao ukupni terpeni. Sličan obrazac, samo u manjoj meri je zapažen i kod *P. patens*, što može da ukazuje na sličnu strategiju koju ove dve vrste koriste kada su u pitanju terpeni. Histohepijskim bojenim reakcijama je potvrđeno prisustvo terpenoida i lipida u značajnoj meri u citoplazmi protoneme i filoida kod svih ispitivanih vrsta.

U literaturi nije poznato kako ABA utiče na sintezu i akumulaciju terpena kod briofita. U ovoj disertaciji, dobijeni rezultati ukazuju da egzogeno dodata ABA različito utiče na koncentraciju ukupnih terpena kod ispitivanih vrsta mahovina (grafik 24). Naime, kod vrsta porodice Funariaceae ona utiče na povećanje koncentracije ukupnih terpena, dok kod halofite *H. heimii* dovodi do višestrukog smanjenja. Međutim, ukoliko se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50mM NaCl nakon predtretmana sa ABA, povećana je sinteza terpenoida kod sve tri vrste. Može se pretpostaviti da predtretman ABA u ovom slučaju pospešuje sintezu i akumulaciju lipofilnih jedinjenja. Visoke koncentracije NaCl (250 mM) utiču na smanjenje koncentracije ukupnih terpena, što je i očekivano. Međutim, i u tom slučaju kod sve tri ispitivane mahovina zabeležena je veoma visoka koncentracija terpena u poređenju sa do sada ispitivanim vrstama biljaka. Treba naglasiti da u okviru ukupnih terpena svoju funkciju ispoljavaju i primarni terpeni (fitohormoni i karotenoidi), ali i specijalizovani, koji učestvuju u zaštiti, pa je veoma potrebno dublje istražiti da bi se došlo do pouzdanog i valjanog odgovora.

Egzogena ABA utiče na smanjenje ukupnih triterpena kod sve tri ispitivane vrste (grafik 26). S obzirom na to da se koncentracija ukupnih terpena povećava kod vrsta *P. patens* i *E. hungaricus*, a ukupni triterpeni opadaju, pretpostavlja se da povećanje vrednosti ukupnih terpena dolazi usled akumulacije nekih drugih terpena i lipofilnih jedinjenja kod ovih vrsta. U citoplazmi ćelija protoneme i filoida se uočavaju obojene strukture koje potvrđuju prisustvo lipidnih jedinjenja (slika 46 i 48), a koje su dobijene specifičnim histohepijskim bojenjem za ukupne lipide. Sa druge strane, trend smanjenja ukupnih triterpena kod *H. heimii* odgovara rezultatima dobijenim za ukupne terpene, pa se može pretpostaviti da su kod ove vrste triterpeni značajna komponenta terpenoida. Za razliku od rezultata dobijenih za ukupne terpene izmerene kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i NaCl (grafik 24), ukupni triterpeni se ne menjaju značajno kod biljaka koje se gaje na podlozi sa dodatkom NaCl nakon predtretmana ABA (grafik 26). Moguće da ABA na neki način interaguje sa sintezom triterpena u ovom slučaju, pa promene u koncentraciji ukupnih triterpena nisu drastične. Histohepijskom analizom terpenoida uočeno je da ABA dovodi do smanjenja intenziteta bojene reakcije, što posredno ukazuje na smanjenje koncentracije terpenoida kod ove vrste (slika 50). Pored toga, na osnovu dominantne plave boje struktura u citoplazmi, može se zaključiti da je došlo do promene sastava terpena usled delovanja ABA, kao i to da su prisutne neke druge lipidne komponente (slika 51).

Veliki diverzitet terpenoidnih jedinjenja kod briofita ukazuje na njihovu odbrambenu ulogu od raznih nepovoljnih uslova sredine (Chen *et al.* 2018). Zbog nepostojanja mehaničkih i provodnih tkiva, briofite su evolutivno napredovale u pravcu što većeg hemodiverziteta, kako bi imale što efikasniju hemijsku zaštitu od biotičkih i abiotičkih stresora. U skladu sa tim je i logična njihova funkcija u mnogim biološkim i ekološkim procesima (Cheng *et al.* 2007). Jedan od razloga za ogromnu raznovrsnost terpenoida kod briofita je postojanje dva specifična gena za sintezu terpena, koji nisu prisutni kod vaskularnih biljaka (Chen *et al.* 2018).

Generalno, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da sve tri ispitivane vrste imaju visoke koncentracije terpenoida, kao i fenolnih jedinjenja i da oni najverovatnije zajednički čine značajnu neenzimsku komponentu zaštite od oksidativnog stresa. Histochemijskim analizama je jasno pokazano prisustvo ovih jedinjenja u protonemi sve tri ispitivane vrste mahovina. Ovo je očekivano pošto su filamenti protoneme u potpunosti izloženi podlozi u kome se nalaze NaCl i ABA, u poređenju sa gametoforima koji su izdignuti iznad podloge, pa manje reaguju na stres. Mesto sinteze terpenoida, akumulacija i/ili skladištenje je svakako u vezi sa anatomijom, morfologijom, razvićem briofita, ali i fiziološkim, biochemijskim i ekološkim karakteristikama, pa je stoga veoma bitno poznavati anatomiju i biologiju ispitivanih vrsta. Mahovine ne poseduju uljana telašca kao što je to slučaj kod jetrenjača, pa je identifikacija i lokalizacija terpena komplikovanija. Pretpostavlja se da mahovine akumuliraju terpenoide u specifičnim kompartmanima ćelija, koji se ponekada mogu detektovati kao lipidne kapljice (Reseman *et al.* 2019). U literaturi su dostupni podaci da se kod mahovina u ćelijama filoida i protoneme mogu zapaziti lipidne kapljice koje sadrže fosfolipide i oleozine (Huang *et al.* 2018). Pokazano je da se kod *P. patens* ove lipidne kapljice sastoje od triacilglicerola i steril estara (Huang *et al.* 2018). U unutrašnjosti ovih struktura se akumuliraju lipofilna jedinjenja, neutralni lipidi i terpenoidi.

Na osnovu rezultata histochemijskih bojenja prikazanih na slikama (slike 46-51), jasno je da se kod kontrolne grupe biljaka sve tri ispitivane vrste detektuju lipidi u protonemi i filoidu. Međutim, reakcije *sudan black B* boje sa ćelijskih strukturama su različite u filoidu i protonemi, što može ukazivati da su različiti tipovi lipida prisutni u ova dva kompartmana biljke. U protonemi se lipidi identifikuju kao male lipidne kapljice, veoma varijabilne u obliku, veličini i morfologiji ukoliko se međusobno porede sve tri ispitivane vrste. Kod *H. heimii* je detektovano mnogo diskretnih lipidnih kapljica, dok je kod vrsta porodice Funariaceae uočena drugačija lokalizacija i obojenost lipida. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim za terpenoidna jedinjenja. NaCl dovodi do povećanja intenziteta obojenosti lipida unutar ćelija, pa se može pretpostaviti da se povećava sinteza lipida ili da oni na neki način menjaju strukturu u uslovima stresa izazvanog NaCl. Kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl kod sve tri ispitivane vrste se zapaža da su lipidne kapljice prisutne u citoplazmi promenile oblik, odnosno, da su gušće konzistencije i uljastije, dok im je sadržaj veoma intenzivno obojen.

Na osnovu histochemijskih bojenih reakcija, pretpostavlja se da ABA utiče na smanjenje sadržaja lipida, posebno kod vrsta *E. hungaricus* i *P. patens* (slike 47 B i 49 B), dok *H. heimii* akumulira lipofilna jedinjenja u brahicitama (slika 51 B). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim za ukupne terpenoide (grafik 22). Generalno se može zaključiti da se kod halofita detektuje veći broj lipidnih jedinjenja nego kod *P. patens*.

Lipidna komponenta kod briofita je najintenzivnije proučavana kod vrste *P. patens* (Resemann *et al.* 2019). Komparativna analiza nekoliko vrsta mahovina pokazala je prisustvo velike količine polinezasićenih masnih kiselina dugog lanca (eng. very long-chain polyunsaturated fatty acids - vl-PUFAs) (Dembitsky *et al.* 1993; Girke *et al.* 1998; Mikami & Hartmann 2004), koja je u pozitivnoj korelaciji sa velikom aktivnošću desaturaza masnih kiselina kod mahovina (Beike *et al.* 2014). Uobičajene masne kiseline koje se sintetišu u endoplazmatičnom retikulumu kod mahovina su arahidonska i eikozapentanoična kiselina (Beike *et al.* 2014; Lu *et al.* 2019). U literaturi su dostupni podaci da sadržaj masnih kiselina može da varira između različitih stadijuma u razviću (Erxleben *et al.* 2012), ali da njihova relativna koncentracija nije značajno različita između filoida i protoneme (Beike *et al.* 2014). Sa druge strane, Lu *et al.* (2019) ukazuju da je arahidonska kiselina detektovana u značajnoj koncentraciji kod pet ispitivanih vrsta mahovina i da potencijalno može da ukaže da je protonema glavno mesto sinteze i akumulacije lipida.

Lipidi su veoma bitna grupa jedinjenja čija je uloga prvenstveno u formiranju membrane, prenosu signala i adaptaciji na uslove stresa (Christie & Han 2012). Oni se generalno definišu kao nehidrofilna jedinjenja u koja se svrstavaju slobodne masne kiseline, trigliceridi, glikolipidi, fosfolipidi, steroli, estri voskova, alkoholi masnih kiselina i terpenoidi.

Masne kiseline se obično ne nalaze u slobodnoj formi u zdravim tkivima i ćelijama, već su u sklopu membrana ili konstituenti triacilglicerida (TAG). Pokazano je da se količina lipida povećava u uslovima stresa (Lu *et al.* 2019) ili se kompozicija lipida može menjati u uslovima *in vitro* (Chiou *et al.* 2001). Visok sadržaj vl-PUFAs je neophodan za preživljavanje niskih temperatura kod briofita (Glime 2007). Pored niskih temperatura, svetlost, pH i mineralna ishrana mogu da stimulišu sintezu vl-PUFAs (Lu *et al.* 2019).

Egzogena ABA smanjuje oštećenja membrane tokom stresa izazvanog sušom kod *A. androgynum* (Guschina *et al.* 2002). Glavna uloga ABA je da aktivira signalnu transdukciju u cilju smanjenja lipidne peroksidacije u ćelijama. ABA interaguje sa specifičnim fosfolipidima u membrani i reguliše metabolizam fosfolipaze D (Frank *et al.* 2000).

Briofite skladište lipide u lipidnim kapljicama (eng. lipid droplets – LDs) koje su prisutne u citoplazmi svih ćelija. Kod vrste *P. patens* LDs su ispunjene oleozinima u tkivima gametofora (Huang *et al.* 2009). Slične strukture se mogu zapaziti na osnovu rezultata histohemije u ovoj disertaciji kod vrsta *H. heimii* i *E. hungaricus*, pa se pretpostavlja da je sastav i organizacija ovih lipidnih kapljica slična kao i kod *P. patens*. Pored unutarćelijske akumulacije lipida, površinski lipidi su prisutni kod briofita i u korelaciji su sa velikim diverzitetom fenolnih jedinjenja briofita. Kutikula *P. patens* se sastoji od kutina i kutikularnih voskova koji se razlikuju od onih kod vaskularnih biljaka (Buda *et al.* 2013). Glavna komponenta kutikularnih voskova su alkoholi masnih kiselina, estri voskova, ali ne i alkani. U sastav kutina ulazi velika količina fenolnih jedinjenja (Resemann *et al.* 2019).

Uopšteno gledano, vrsta *H. heimii* u najvećoj meri sintetiše i akumulira lipide i terpenoide, čija se koncentracija značajno smanjuje kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl. Vrste *P. patens* i *E. hungaricus* akumuliraju prvenstveno lipide i fenolna jedinjenja, dok se koncentracija terpenoida povećava značajno kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl.

## 5.4. Određivanje antioksidativnog kapaciteta biljaka

Antioksidativni kapacitet ekstrakta ispitivanih vrsta mahovina je određivan korišćenjem tri različite metode (DPPH metoda, određivanje redukcionog potencijala i test  $\beta$ -karoten/linolna kiselina). Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su generalno u saglasnosti sa do sada publikovanim zapažanjima kod biljaka.

Smatra se da su briofite veoma bogate sekundarnim metabolitima i da su veoma dobro adaptirane na oksidativni stres, zbog postojanja efikasnih antioksidativnih mehanizama (Nagae *et al.* 2008). Briofite u velikoj količini sintetišu i akumuliraju biološki aktivna jedinjenja (Asakawa 2007; Sabovljević *et al.* 2017) među kojima su najbrojnija fenolna jedinjenja, bibenzili, mono-, di-, tri- i seskviterpenoidi, flavonoidi i dihidrostilbeni, kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Pored navedenih, značajne su i druge neenzimske komponente kod briofita: askorbat, glutation, polioli, karoteni i tokoferol.

DPPH test govori o sposobnosti ekstrakata ispitivanih vrsta da inhibiraju aktivnost DPPH radikala, a potencijalno i o ukupnoj antioksidativnoj sposobnosti biljaka. Rezultati dobijeni u ovoj

disertaciji (grafik 27 i 28) ukazuju da ispitivane vrste mahovina imaju relativno visoku antioksidativnu aktivnost, bilo da se gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl, bilo da se pre gajenja na hranljivoj podlozi izlažu dejstvu ABA. Generalno, NaCl utiče na smanjenje sposobnosti mahovina da „hvataju“ DPPH radikal, odnosno, na smanjenje antioksidativne sposobnosti sve tri ispitivane vrste (grafik 27). Međutim, egzogeno dodata ABA utiče na povećanje antioksidativne sposobnosti ovih vrsta ukoliko se one nakon predtretmana ABA gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl (grafik 28), pa se može zaključiti da ABA povećava antioksidativni kapacitet biljaka. Moguće je da ABA pokreće neke antioksidativne mehanizme, bilo enzimske, bilo neenzimske, pa da na taj način doprinosi povećanju DPPH vrednosti. Generalno gledano, antioksidativna sposobnost uklanjanja DPPH radikala je veća kod vrsta *P.patens* i *H.heimii* nego kod *E.hungaricus*.

Prethodna istraživanja na vrsti *E. hungaricus* pokazuju porast DPPH aktivnosti od 30% u kontrolnom uzorku, do 60% na najvećoj primenjenoj koncentraciji soli (Ćosić *et al.* 2018). Ono što se primećuje jeste porast sposobnosti biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA da uklone DPPH radikal, što potencijalno ukazuje da ABA zapravo stimuliše antioksidativnu aktivnost i u odsustvu stresogenog faktora, u ovom slučaju NaCl.

Redukcioni potencijal je mera sposobnosti biljaka da vrše redukciju jona gvožđa, čime se može analizirati antioksidativna aktivnost ekstrakta biljaka. Dobijeni rezultati ukazuju na to da ispitivane vrste mahovina imaju visoku sposobnost redukcije jona gvožđa, čak i ukoliko se gaje na hranljivoj podlozi sa visokom koncentracijom NaCl (grafik 27). Egzogeno ABA ne dovodi do značajnijih promena u vrednostima redukcionog potencijala (grafik 28), pa se može pretpostaviti da nema uticaja na ovaj aspekt antioksidativne sposobnosti ispitivanih mahovina. Za razliku od rezultata dobijenih DPPH testom, u ovom slučaju je redukcioni potencijal najviši za vrstu *E. hungaricus*. Moguće je da ovakvi raznoliki rezultati ukazuju da ispitivane vrste koriste različite mehanizme antioksidativne zaštite, ali su potrebni dodatni testovi koji bi to potvrdili.

Antioksidativni kapacitet mnogih do danas ispitivanih vrsta briofita je veći u poređenju sa ispitivanim traheofitama (Aslanbaba *et al.* 2017). Međutim, postoje značajne razlike u antioksidativnom potencijalu u zavisnosti od ispitivane vrste briofita. Korišćenjem različitih metoda za određivanje antioksidativnog potencijala kod 4 vrste mahovina Chobot *et al.* (2008) su uočili razliku u odgovoru na ROS i RNS. Ekstrakti *A. undulatum* i *P. formosum* pokazuju jaču antioksidativnu aktivnost u poređenju sa druge dve ispitivane vrste, *Pleurozium schreberi* i *Thuidium tamariscinum*. U eksperimentima koji simuliraju dugotrajni stres izazvan NaCl, pokazano je da usled povećane antioksidativne aktivnosti veći broj biljaka u okviru vrste *E. hungaricus* preživljava (Vujičić *et al.* 2014).

Proučavanje antioksidativne aktivnosti briofita (*Oxytegus tenuirostris*, *Eurhynchium striatum* i *Rhynchostegium murale*) ukazuje da je klimatski faktor zaista bitan ekološki faktor koji određuje antioksidativnu sposobnost biljaka. Naravno, antioksidativna aktivnost varira između ispitivanih vrsta i u okviru iste vrste (Yayintas *et al.* 2017). Ukupna aktivnost jedinjenja koji su skevendžeri radikala je veoma visoka kod *E. striatum* i *Homalothecium sericeum* (Erturk *et al.* 2015). Takođe, *Sanionia uncinata* produkuje dosta sekundarnih metabolita i pokazalo se da ima izuzetnu antioksidativnu sposobnost (Bhattarai *et al.* 2008). Pored ovih vrsta, ispitivana je i *Polytrichastrum alpinum* koja ima višestruko veću antioksidativnu aktivnost ekstrakata. Ovi svi podaci idu u prilog tvrdnji da briofite generalno imaju visok antioksidativni kapacitet.

*β*-karoten/linolna kiselina test se koristi za demonstraciju očuvanja neenzimske komponente, prvenstveno β-karotena, usled delovanja slobodnih radikala i oksidativnog stresa. U kontrolnim uzorcima sve tri ispitivane vrste nije detektovan β-karoten (tabela 10), što može da ukazuje na to da se ova komponenta koristi ili troši, pa je njena koncentracija ispod granice detekcije ili da neka druga jedinjenja dominiraju kod kontrolnih biljaka, pa se smanjuje mogućnost detekcije karotena u uzorku. Slični rezultati se uočavaju i kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl. Izuzetno se β-karoten detektuje kod *P. patens* usled delovanja 250 mM NaCl. Sa druge strane, egzogeno dodata ABA utiče na očuvanje β-karotena kod sve tri ispitivane vrste kada se gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA i NaCl, pa je moguće detektovati značajne vrednosti kod sve tri ispitivane vrste, a posebno kod *E. hungaricus* i *H. heimii*. Pretpostavlja se da ABA posredno aktivira neke enzime u biosintezi karotena ili utiče na sintezu drugih jedinjenja koja održavaju nivo β-karotena i karotenoida generalno.

Poznato je da su karotenoidi lipofilni antioksidansi i da učestvuju u detoksifikacijirazličitih oblika ROS (Young 1991). Kao antioksidansi karotenoidi uklanjaju singlet kiseonik, smanjuju oksidativna oštećenja i sprečavaju formiranje tripletnog stanja hlorofila, odnosno smanjuju mogućnost formiranja singlet kiseonika. Sposobnost karotenoida da spreči formiranje tripleta hlorofila i singlet kiseonika je usled postojanja dvostrukih konjugovanih veza u hemisjkoj strukturi. Time se omogućuje apsorpcija energije od ekscitiranih molekula i vrši disipaciju energije u vidu toplote (Mittler 2002).

Dobijeni rezultati za ispitivane vrste su u korelaciji sa rezultatima dobijenim za ukupnu koncentraciju fenolnih jedinjenja u uzorcima i ukazuju na to da ispitivane vrste koriste fenole, ali i karotenoide, kao vid neenzimske zaštite u toku odgovora biljaka na stres solima. Pored toga, iz ovih rezultata se može zaključiti da visokoj antioksidativnoj aktivnosti ne doprinosi samo neenzimska komponenta, već veliki udeo antioksidativne zaštite pripada aktivnosti antioksidativnih enzima.

## 5.5. Analiza sadržaja šećera

Ugljeni hidrati ili šećeri su veoma značajna komponenta u procesima rastenja i razvića biljaka kao i odgovoru na biotički i abiotički stres. Prvenstveno, šećeri čine bitnu strukturnu komponentu biljaka pri čemu učestvuju u izgradnji ćelijskog zida i membrana, a sa druge strane šećeri ostvaruju svoje metaboličke funkcije u signalnoj transdukciji i posrednoj kontroli ekspresije gena (Rosa *et al.* 2009; Klavina 2014; Klavina 2018). Pored toga što su izvor energije za razne metaboličke procese, šećeri učestvuju u komunikaciji biljke sa spoljašnjom sredinom i odbrani biljaka od stresa koji nastaje delovanjem abiotičkih, biotičkih i antropogenih činilaca, tako što održavaju osmotsku homeostazu i/ili učestvuju kao antioksidansi pri delovanju oksidativnog stresa (Couée *et al.* 2006; Klavina 2014).

Pored značajne raznovrsnosti sekundanih metabolita, briofite sintetišu i akumuliraju veliki broj različitih šećera i šećernih alkohola. Za razliku od vaskularnih biljaka kod kojih su se razvijala vaskularna tkiva, kutikula i stome, kod briofita je evolucija tekla u pravcu uslozňavanja sadržaja metabolita u cilju preživljavanja nepovoljnih uslova sredine (Klavina 2014). Uprkos malom broju istraživanja sadržaja šećera kod mahovina (osim istraživanja sprovedenim na vrstama roda *Sphagnum*), opšte je prihvaćeno da su karakteristični polisaharidi briofita ksiloglukani, uronske kiseline, manoza, glukani i 3-*O*-metilramnoza (Popper *et al.* 2003).

U ovoj doktorskoj disertaciji potvrđeno je prisustvo velikog broja šećera kod sve tri ispitivane vrste mahovina. Najzastupljeniji šećeri pripadaju grupi rastvorljivih šećera, monosaharida i disaharida, kao što su fruktoza, glukoza, maltoza i saharoza (grafik 31 i 32). Pored navedenih, detektovan je veliki



broj drugih šećera koji se kod sve tri ispitivane vrste akumulira u značajnoj meri. Rastvorljivi šećeri imaju ulogu osmoprotektanata i primarnih prenosioca signala (Yuanyuan *et al.* 2009). U literaturi su dostupni podaci koji ukazuju da se kod briofita vrši sinteza i akumulacija D-glukoze, D-galaktoze, D-manoze, D-ksiloze i L-fukoze (Klavina 2014; Klavina 2018), ali i saharoze, fruktoze i fruktozida (Chopra & Kumra 1988). Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji su potvrdili prisustvo glukoze, galaktoze, manoze, ksiloze, saharoze i fruktoze kod sve tri ispitivane vrste mahovina. Generalno se šećeri rastvorljivi u vodi sintetišu i akumuliraju kod biljaka tokom abiotičkog stresa (Rosa *et al.* 2009), pri čemu se značajno menjaju koncentracije saharoze, fruktoze i glukoze, što je potvrđeno i u ovoj doktorskoj disertaciji. Pored toga, metaboličke studije na vrsti *P. patens* su ukazale na to da se akumuliraju pretežno monosaharidi glukoza, fruktoza i altroza i disaharidi maltoza i izomaltoza tokom isušivanja (Erxleben *et al.* 2012). Vujičić (2016) je utvrdio prisustvo visoke koncentracije glukoze, fruktoze i saharoze kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii*, pri čemu se kod *H. heimii* u najvećoj koncentraciji nalaze glukoza i saharoza, dok je kod *E. hungaricus* najzastupljenija fruktoza. Za razliku od njih, kod *P. patens* su detektovani svi navedeni šećeri, ali u manjoj meri (Vujičić 2016), pa se pretpostavlja da brio-halofite akumuliraju šećere u većoj meri nego nehalofitna mahovina *P. patens*. Ovakvi rezultati impliciraju da šećeri igraju važnu ulogu kao osmoprotektanti kod brio-halofitnih ispitivanih vrsta. Takođe, utvrđeno je da *H. heimii* ima predefinisan visok nivo saharoze, koji se održava i kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl, dok vrsta *E. hungaricus* na NaCl reaguje tako što brzo povećava sintezu fruktoze i glukoze. Vrsta *P. patens* povećava koncentraciju saharoze, fruktoze i glukoze kada se gaji na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl (Vujičić 2016). Međutim, nemaju svi šećeri rastvorljivi u vodi istu funkciju kod biljaka. Naime, saharoza i glukoza su prvenstveno supstrati za disanje ili učestvuju kao osmoliti u osmoregulaciji (Gupta & Kaur 2005), pa se smanjenje ili povećanje njihove koncentracije treba posmatrati u tom kontekstu, dok fruktoza ne učestvuje primarno u osmoregulaciji, već je u tesnoj vezi sa metabolizmom sekundarnih metabolita (Rosa *et al.* 2009). Hilal *et al.* (2004) je ukazao na vezu između fruktoze i eritrozo-4-fosfata, koji je supstrat za sintezu lignina i fenolnih jedinjenja, pa se možda povećana koncentracija fruktoze može dovesti u vezu sa povećanom koncentracijom fenolnih jedinjenja. Ova konstatacija je potvrđena u ovoj doktorskoj disertaciji kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl kod vrste *E. hungaricus* (tabela 13, grafik 31 B). Smanjenje koncentracije fruktoze potencijalno utiče na izrazito povećanje koncentracije p-CA i Ka kod vrste *E. hungaricus* (grafik 31B). Sličan rezultat, samo u manjoj meri izražen se zapaža kod vrste *P. patens* (tabela 12, grafik 31 A). Pored smanjenja fruktoze, značajno je napomenuti smanjenje koncentracija saharoze, galaktoze i riboze, koji moguće imaju vezu sa sekundarnim metabolizmom kod *E. hungaricus*. U literaturi je poznato da se kod briofita tokom desikacije akumuliraju rastvorljivi šećeri, dok se koncentracije redukujućih šećera, kao što su glukoza i fruktoza, smanjuje (Smirnoff 1992).

Sa druge strane, neke vrste briofita akumuliraju *species* - specifične šećere i šećerne alkohole kao što su fruktooligosaharid 1-kestoza kod *Rhodobryum ontariense* (Pejin *et al.* 2012a, 2012b; Klavina 2014) ili polimer sličan pektinu, sfagnan kod vrsta roda *Sphagnum* (Klavina 2014). U ovoj doktorskoj disertaciji nisu analizirani šećeri koji bi se mogli smatrati *species* – specifičnim. Međutim, na osnovu dobijenih rezultata u ovoj disertaciji, može se pretpostaviti da izomaltoza značajno doprinosi održavanju osmotske homeostaze kod vrste *E. hungaricus*, s obzirom na to da se njena koncentracija značajno povećava kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl, dok isti šećer kod *P. patens* i *H. heimii* ne menja značajno koncentraciju usled dodavanja NaCl u hranljivu podlogu. Sa druge strane, koncentracija trehaloze se specifično povećava kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl kod vrsta *P. patens* i *H. heimii*, ali ne i *E. hungaricus*, što ukazuje na različit način akumulacije šećera.

Za razliku od mono- i disaharida, trisaharidi su retko potvrđeni i identifikovani kod biljaka. U ovoj doktorskoj disertaciji je utvrđeno prisustvo maltotrioze, izomaltotrioze i panoze kod sve tri ispitivane vrste mahovina, ali njihova koncentracija nije prelazila 5 g/kg. Poznato je da trisaharid 1-kestoza verovatno omogućava specijalne fiziološke karakteristike kod jedne od briofita (*R. ontariense*) i moguće da je veoma značajna kod drugih mahovina koje naseljavaju nepovoljna staništa. Pored trisaharida, u ovoj disertaciji detektovani su šećerni alkoholi, čija se koncentracija kod biljaka menja u zavisnosti od koncentracije NaCl u hranljivoj podlozi. Posebno se može zapaziti da su kod sve tri ispitivane vrste u najvećoj meri prisutni galaktitol i sorbitol (grafik 31 i 32), kao i to da se kod *P. patens* sorbitol nalazi u najvećoj koncentraciji kod kontrolne grupe biljaka, dok koncentracija galaktitola raste kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl. Za razliku od nje, kod brio-halofita *E. hungaricus* i *H. heimii* koncentracija sorbitola i galaktitola raste kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl. U literaturi se može naći podatak da su kod mahovina tokom isušivanja identifikovani sorbitol i manitol, kao i rafinoza (Oliver *et al.* 2005), dok su kod jetrenjača od značaja volemitol, L-bornezitol, D-manitol – jedinjenja koja nisu detektovana kod mahovina (Klavina 2014).

Ne akumuliraju se svi šećeri podjednako u protonemi i gametoforu kod mahovina. Erxleben *et al.* (2012) su utvrdili da se neki od metabolita mogu detektovati isključivo u protonemi biljaka kada su pod uticajem stresa izazvanog NaCl i suše. Gametofori akumuliraju kvantitativno više metabolita nego protoneme i to prvenstveno neutralne monosaharide, disaharide i šećerne alkohole (poliole), kao što su fruktoza, guloza, altoza, maltoza i izomaltoza. Pored toga, isušivanje može da indukuje akumulaciju veoma specifičnih šećera u *in vitro* uslovima, kao što je trehaloza, koja odsustvuje kod drugih viših biljaka (Stewart and Larher 1980) ili galaktinol kod *P. alpinum* (Zúñiga-González *et al.* 2016). Galaktinol kod *P. patens* učestvuje u zaštiti od oksidativnog stresa (Erxleben *et al.* 2012).

U ovoj doktorskoj disertaciji histohemijskim bojenjem utvrđeno je prisustvo šećera koji se pretežno akumuliraju u citoplazmi i ćelijskom zidu protoneme i filoida kod sve tri ispitivane vrste mahovina. Međutim, brio-halofite *H. heimii* i *E. hungaricus* pokazuju nešto intenzivniju bojenu reakciju u poređenju sa *P. patens*, pa se može pretpostaviti da postoje različiti tipovi šećera koji su dominantno prisutni kod ovih vrsta (slika 54 i 56). Kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl uočava se prisustvo intenzivne crvene boje u citoplazmi protoneme, kao i ćelijskim zidovima kod vrste *E. hungaricus* i *H. heimii* na osnovu čega se može pretpostaviti veća količina šećera, što je potvrđeno i HPLC analizom. U citoplazmi se generalno akumuliraju šećeri rastvorljivi u vodi, čija je povećana koncentracija i potvrđena, dok se u ćelijskom zidu mogu nalaziti šećeri koji inače ulaze u izgradnju primarnog i sekundarnog ćelijskog zida, a koji nisu identifikovani u ovoj disertaciji. Glavne komponente ćelijskog zida mahovina su hemiceluloza, celuloza i pektini, slično kao i kod vaskularnih biljaka (Maksimova *et al.* 2013; Klavina 2014), dok se lanci pektina i ksiloglukana, uronske kiseline i galakturonske kiseline češće nalaze kod jetrenjača. Međutim, sastav ćelijskog zida je često veoma varijabilan i specifičan za vrstu, mada se smatra da je sastav ćelijskog zida mahovina dosta jednostavniji u poređenju sa vaskularnim biljkama (Carpita & Gibeaut 1993). Osim što nedostaje lignin, u ćelijskim zidovima briofita ne može se detektovati ni pektinski polisaharid ramnogalakturonan II (Matsunga *et al.* 2004). Međutim, specifični metil-esterifikovani homogalakturonan je prisutan u ćelijama koje provode vodu (eng. water-conducting cells – WCCs) kod Bryales i Polytrichales (Ligrone *et al.* 2012).

U literaturi su dostupni različiti podaci o delovanju ABA na koncentraciju šećera kod briofita. Naime, kod nekih vrsta kao što su jetrenjače *R. fluitans* i *Pallavicinia lyellii*, ABA dovodi do povećanja koncentracije ukupnih šećera prilikom stresa niskih temperatura i isušivanja, što je u pozitivnoj korelaciji sa povećanjem tolerancije na stres kod ovih vrsta (Pence *et al.* 2006). Sa druge strane, kod *M.*

*polymorpha* egzogeno dodavanje ABA u hranljivu podlogu ne utiče pozitivno na povećanje preživljavanja i sintezu šećera (Pence *et al.* 2006). U ovoj doktorskoj disertaciji je utvrđeno da ABA utiče na smanjenje koncentracije određenih vrsta šećera kod sve tri ispitivane vrste mahovina i to glukoze, fruktoze, riboze, saharoze, izomaltoze i manitola, dok su koncentracije ostalih šećera pod uticajem ABA specifične za vrstu. Međutim, kada se biljke gaje na hranljivoj podlozi sa dodatkom 50 mM NaCl nakon predtretmana ABA uočava se povećana sinteza šećera fruktoze, glukoze, galaktoze, sharoze i izomaltoze, koji su identifikovani u značajnoj koncentraciji, što je posebno uočljivo za vrstu *E. hungaricus*, (grafik 32 B). Kod vrste *P. patens* se povećava koncentracija drugih šećera, dok se kod *H. heimii* uočava smanjenje koncentracije svih šećera osim glukoze. Međutim, kada se poveća koncentracija NaCl u hranljivoj podlozi kod biljaka predtretiranih ABA, jasno se uočava povećanje koncentracije šećera, što je sigurno jedan od faktora koji doprinosi preživljavanju biljaka i toleranciji na stres izazvan NaCl. Može se uočiti da ABA utiče na akumulaciju šećera kod sve tri ispitivane vrste mahovina, a posebno kada se one suoče sa intenzivnijim, dugotrajnim stresom izazvanim NaCl. Generalno, ABA ne dovodi do povećane sinteze šećera u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka, niti se uočavaju razlike u tipu šećera koji se sintetišu između eksperimenta I i II. Histochemijskim bojenjem je utvrđen manji intenzitet obojenosti u citoplazmi protoneme i filoida kod sve tri vrste što ukazuje na smanjenje koncentracije šećera koji se akumuliraju u biljkama (slike 53, 55 i 56). Histochemijski rezultati u potpunosti odgovaraju rezultatima dobijenim HPLC analizom, jer se kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom NaCl nakon predtretmana ABA uočava intenzivnija boja, ali prvenstveno u ćelijskim zidovima. Sličan rezultat je zapažen i za fenolna jedinjenja, što ukazuje da ABA utiče na promenu koncentracije šećera i fenolnih jedinjenja, a verovatno i na promenu sastava ćelijskog zida.

## 5.6. Detekcija reaktivnih oblika kiseonika

Produkcija slobodnih radikala, prvenstveno  $\cdot\text{OH}$  radikala, potvrđena je kod sve tri ispitivane vrste mahovina korišćenjem EPR tehnike. Poznato je da ROS, pored svojih negativnih svojstava po biljku, mogu da igraju bitnu ulogu u signalnoj transdukciji prilikom rasteñja i razvića biljaka, ali i u odbrani od biotičkog i abiotičkog stresa (Richards *et al.* 2014; Steffen-Heins & Steffen 2015). Međutim, malo je poznato o mehanizmima koji doprinose održavanju ROS na niskom nivou u ćelijama. Njihova kvantifikacija je otežana zbog veoma kratkog života radikalskih formi, kao i postojanja antioksidativnih enzima u ćelijama (Steffen-Heins & Steffen 2015). Jedna od metoda koja uspešno kvantifikuje i identifikuje prisutne ROS, kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* sistemima je EPR (Mojović *et al.* 2005b).

U ovoj disertaciji je korišćen spin trap DEPMPO, koji može specifično da detektuje  $\cdot\text{OH}$  i  $\cdot\text{O}_2^-$  radikale. Međutim, veoma često se događa konverzija DEPMPO/OOH adukata, koji nastaju reakcijom DEPMPO sa  $\cdot\text{O}_2^-$  radikalima, u DEPMPO/OH adukate, te se nastanak ova dva radikala u membranama biljnih ćelija ne može jasno razdvojeno tumačiti. Naime, u ovoj doktorskoj disertaciji su kvantifikovani  $\cdot\text{OH}$  radikali, ali se ne može sa sigurnošću utvrditi da li i u kojoj meri postoji produkcija  $\cdot\text{O}_2^-$  radikala. Moguće je pretpostaviti postojanje efikasnih mehanizama uklanjanja ROS, među kojima su najznačajniji enzimi koji uklanjaju  $\cdot\text{O}_2^-$  i posredno utiču na nastanak  $\cdot\text{OH}$  radikala, kao što su enzimi SOD. Pored kvantifikacije ROS, potrebno je lokalizovati produkciju ROS, jer je poznato da se, pored nastanka u unutrašnjosti ćelija,  $\cdot\text{OH}$  radikali produkuju primarno u ćelijskom zidu, dok  $\cdot\text{O}_2^-$  radikali mogu nastati i u membrani i u ćelijskom zidu (Mojović *et al.* 2005a).

Generalno, ROS se produkuju ekstracelularno u ćelijskom zidu i plazmalemi, i intracelularno u hloroplastima, mitohondrijama i peroksizomima (Das & Roychoudhury 2014; Richards *et al.* 2014). Za

razliku od drugih ROS, biljke ne poseduju enzime koji uklanjaju  $\cdot\text{OH}$  radikale, već se oni otklanjaju posredstvom flavonoida i prolina (Das & Roychoudhury 2014), pa je glavni mehanizam kontrole njihove koncentracije u biljnim ćelijama ograničavanje njihove produkcije (Richards *et al.* 2014). Postoje najmanje dva načina produkcije  $\cdot\text{OH}$  radikala u biljnim ćelijama. Prvenstveno, oni mogu nastati putem enzimске aktivnosti POX i SOD ekstracelularno, ali i u prisustvu prelaznih metala kao što su Fe i Cu u Fentonovoj reakciji.

Do sada je uspešno identifikovana produkcija  $\cdot\text{OH}$  radikala u plazmalemi i ćelijskom zidu. Poznato je da biljke poseduju klasu III peroksidaza, koje se nalaze u ćelijskom zidu ili u unutrašnjosti ćelije. One mogu učestvovati u katalizi  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ali i u formiranju  $\cdot\text{OH}$  radikala (Hadži-Tašković Šukalović *et al.* 2010). U prisustvu  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\cdot\text{O}_2^-$  one prelaze iz  $\text{Fe}^{3+}$  oblika u  $\text{Fe}^{2+}$  oblik i mogu da redukuju  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\cdot\text{O}_2^-$  do  $\cdot\text{OH}$  radikala (Chen & Schopfer 1999). Pored samostalne aktivnosti, predloženo je delovanje POX zajedno sa SOD u ćelijskom zidu u cilju formiranja  $\cdot\text{OH}$  radikala (Kukavica *et al.* 2009). Fenolna jedinjenja koja se nalaze u ćelijskom zidu, kao što su hidroksicinamati, mogu podleći autooksidaciji pri čemu se formira  $\cdot\text{O}_2^-$  radikal, koji je supstrat za Mn-SOD, te se stvara  $\text{H}_2\text{O}_2$ . POX dalje mogu koristiti  $\text{H}_2\text{O}_2$  za formiranje  $\cdot\text{OH}$  radikala. Dodatno, oksidaze ćelijskog zida (poliamin oksidaza i Cu-amin oksidaza) koje utiču na stvaranje  $\text{H}_2\text{O}_2$  se mogu posmatrati kao neposredna mesta produkcije  $\cdot\text{OH}$  radikala (Planas-Portell *et al.* 2013). Pored jona Fe, pokazano je da joni Cu mogu uticati na produkciju  $\cdot\text{OH}$  radikala u ćelijskom zidu. Drażkiewiicz *et al.* (2004) ukazuju da ukoliko askorbat redukuje  $\text{O}_2$  u  $\text{H}_2\text{O}_2$  neenzimskim putem i  $\text{Cu}^{2+}$  se oksiduje u  $\text{Cu}^+$ , moguća je reakcija  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{Cu}^+$  i formiranje  $\cdot\text{OH}$  radikala u Fentonovoj reakciji.

Pored nastanka  $\cdot\text{OH}$  radikala u ćelijskom zidu, poznato je da je aktivnost NAD(P)H oksidaze (NOX) glavni uzrok njegovog nastanka u plazmalemi (Kuźniak & Urbanek 2000). NOX imaju sposobnost da transportuju elektron sa NAD(P)H iz citoplazme do spoljašnje strane membrane gde utiču na stvaranje  $\cdot\text{O}_2^-$  radikala (Richards *et al.* 2014). Pored toga, mehanizam produkcije  $\cdot\text{O}_2^-$  radikala pretpostavlja da  $\cdot\text{O}_2^-$  radikal nastaje usled aktivnosti peroksidaza zavisnih od NADPH u ćelijskom zidu ili plazmalemi (Askerlund *et al.* 1987). S obzirom na to da nastaje  $\text{H}_2\text{O}_2$ , moguć je nastanak  $\cdot\text{OH}$  radikala u Fentonovoj reakciji u ćelijskom zidu (Liszakay *et al.* 2003). Intracelularno  $\cdot\text{OH}$  radikali mogu nastati ukoliko se  $\cdot\text{O}_2^-$  radikala i  $\text{H}_2\text{O}_2$  nastali u organelama oslobode i reaguju sa dostupnim jonima metala (Keunen *et al.* 2011). Međutim, to se generalno dešava ukoliko su procesi fotosinteze i disanja poremećeni.

Kod vrste *P. patens* identifikovana je najveća količina  $\cdot\text{OH}$  radikala, dok se kod brio-halofitnih vrsta nivo produkcije  $\cdot\text{OH}$  radikala održava na relativno niskom nivou (grafik 29). Pretpostavlja se da je kod ovih vrsta antioksidativna aktivnost na određen način predefinisana, odnosno, da su mehanizmi donekle aktivni i u odsustvu stresogenog faktora. Za razliku od njih, kod nehalofitne mahovine *P. patens* posledica velike produkcije  $\cdot\text{OH}$  radikala je moguća zbog povećanog intenziteta fotosinteze, ali i zbog smanjene aktivnosti antioksidativnih enzima. Vujičić (2016) je pokazao prisustvo i aktivnost antioksidativnih enzima CAT, POX i SOD kod vrsta *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii*. Uočeno je da vrsta *H. heimii* ima najveću aktivnost POX, dok je kod *P. patens* u kontrolnoj grupi biljaka najaktivniji enzim SOD. Ovakvi rezultati moguće objašnjavaju izmerenu veliku količinu  $\cdot\text{OH}$  radikala kod *P. patens*, s obzirom na to da povećana aktivnost SOD dovodi do stvaranja  $\text{H}_2\text{O}_2$ , koji je zapravo neophodan za formiranje  $\cdot\text{OH}$  radikala u Fentonovoj reakciji u prisustvu jona Fe ili Cu. To je i potvrđeno egzogenim dodavanjem  $\text{H}_2\text{O}_2$  kod graška, kod koga je aktivna Mn-SOD i POX, a prisutna hidroksicimetna kiselina u ćelijskom zidu, nakon čega je došlo do Fentonove reakcije i nastanka  $\cdot\text{OH}$  radikala (Kukavica *et al.* 2009). Pored toga, poznato je da stres izazvan sušom povećava dostupnost Fe i Cu za odigravanje Fentonove reakcije, te može doći do povećane produkcije  $\cdot\text{OH}$  radikala (Moran *et*

al. 1994). Pokazano je da stres izazvan solima kod *A. thaliana* pospešuje formiranje  $\cdot\text{OH}$  radikala, jer se povećava aktivnost NOX (Chung *et al.* 2008).

Pored detektovanog  $\cdot\text{OH}$  radikala, u kontrolnoj grupi biljaka kod *P. patens* zabeleženo je prisustvo askorbil radikala ( $\text{Asc}^{\cdot-}$ ), što ukazuje na prisustvo aktivne neenzimske komponente kod ove vrste, a posebno askorbata. Smatra se da askorbat učestvuje u procesima rastanja i razvića biljaka u apoplastu, kao i hipersenzitivnom odgovoru biljaka na stres (Cordoba-Pedregosa *et al.* 1996), tako što inhibira ili pospešuje oksidativne reakcije (Fry 1998). Askorbat može da bude donor za mnogobrojne enzimске i neenzimske reakcije. Pored toga što se sintetiše u citoplazmi, askorbat je u velikoj meri prisutan u apoplastu, gde učestvuje u prvoj liniji odbrane biljaka od štetnog uticaja ROS (Das & Roychoudhury 2014). On reaguje sa  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$  i  $\cdot\text{OH}$  radikalima, ali i regeneriše  $\alpha$ -tokoferol od tokoferol radikala, pa tako utiče na zaštitu membrana od oksidativnih oštećenja (Shao *et al.* 2005). Askorbat takođe posredno utiče na koncentraciju i prisustvo fenolnih jedinjenja u ćelijskom zidu. Naime, ukoliko se produkuje  $\text{H}_2\text{O}_2$ , on može reagovati sa fenolnim jedinjenjima i pretvoriti ih peroksidacijom u fenoksi radikale (Veljović-Jovanović *et al.* 2005), koji se onda na spontan način kombinuju i formiraju polimere. Askorbat u ovom slučaju je sekundarni donor peroksidazne reakcije i vodi ka inhibiciji stvaranja polimera (Takahama 1993).

Kod brio-halofita *E. hungaricus* i *H. heimii* nije identifikovan  $\text{Asc}^{\cdot-}$  u kontrolnoj grupi biljaka, što može da ukaže na to da je askorbat-glutationski ciklus veoma efikasan, pa ne dolazi do stvaranja  $\text{Asc}^{\cdot-}$  ili da nema potrebe za njegovom aktivnošću. Međutim, kod biljaka vrste *H. heimii* gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom 250 mM NaCl detektuje se prisustvo  $\text{Asc}^{\cdot-}$ , pa je moguće da u ovom slučaju dolazi do intenzivne produkcije  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a da enzimski mehanizmi ne vrše uklanjanje radikala sa istom efikasnošću kao kada se biljke gaje na podlozi sa dodatkom manje količine soli (50 mM koncentracija). Kod vrste *E. hungaricus* se zapaža da je produkcija  $\cdot\text{OH}$  radikala na niskom nivou, kao i to da nema prisutnog  $\text{Asc}^{\cdot-}$  radikala. Ovakve razlike u prisustvu i količini ROS kod ispitivanih vrsta ukazuju na različitu aktivnost antioksidativnih mehanizama koje one koriste u odbrani od oksidativnog stresa. Generalno, kako bi se dobijeni rezultati najkompletnije i najtačnije tumačili potrebno je u daljim istraživanjima kvantifikovati neenzimsku komponentu, kao što je Asc i tokoferol, ali i aktivnost enzima askorbat-glutationskog ciklusa.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji u eksperimentu II ukazuju da ABA dovodi do povećanja produkcije  $\cdot\text{OH}$  radikala kod sve tri ispitivane vrste mahovina, a posebno kod vrsta *P. patens* i *H. heimii* (grafik 30). S obzirom na to da je utvrđeno da se kod biljaka gajenih na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA uočava akumulacija fenolnih jedinjenja u ćelijski zid i zadebljavanje ćelijskog zida kod vrsta *P. patens* i *H. heimii* (slike 29 B i 33 B), pretpostavlja se da je upravo to razlog povećane koncentracije detektovanih radikala. Lignifikacija ili zadebljavanje ćelijskog zida kod biljaka se dešava kroz oksidativne reakcije koje omogućavaju umrežavanje hidroksicimetnih alkohola u reakciji katalizovanoj peroksidazama (Veljović-Jovanović *et al.* 2005). Peroksidaze dovode do redukcije kiseonika i formiranja  $\cdot\text{O}_2^-$  radikala i  $\text{H}_2\text{O}_2$  redukujući supstrate kao što su NADH i dihidrofumarat, što vodi ka formiranju  $\cdot\text{OH}$  radikala (Halliwell 1977; Chen & Schopfer 1999). Povećana peroksidazna aktivnost je detektovana kod mahovina *P. patens*, *E. hungaricus* i *H. heimii* (Vujičić 2016), što može ukazati da su POX u ćelijskom zidu aktivne i da doprinose stvaranju  $\cdot\text{OH}$  radikala. Dokazano je da su POX ćelijskog zida ključne za formiranje DEPMP/OH adukta i to u prisustvu  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kukavica *et al.* 2009). U ćelijskom zidu se nalazi klasa III peroksidaza, kao što je napomenuto, a čija je uloga u lignifikaciji ćelijskog zida i umrežavanju fenolnih komponenti uz prisustvo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kolattukudy 1980). Kada oksiduju fenolna jedinjenja, peroksidaze dovode do formiranja  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Vujičić (2016) je utvrdio postojanje klase III peroksidaza kod sve tri vrste mahovina. Međutim, jedino se kod *P. patens* klasa III



nalazi i kod kontrolne grupe biljaka, naslućujući njenu aktivnost kod ove vrste u optimalnim uslovima, dok se kod brio-halofita njena aktivnost indukuje egzogeno dodatim NaCl (Vujić 2016). Pretpostavlja se da je slična reakcija biljaka i na egzogeno dodatu ABA, s obzirom na to ABA može da indukuje signalne puteve koji se inače aktiviraju u stresu izazvanom NaCl. Pored toga, kada se ABA veže za svoje receptore, SnRK2 komponenta može da aktivira NADPH oksidazu na plazmalemi i da dovede do produkcije  $\cdot\text{O}_2^-$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  putem aktivacije CuZn-SOD (Sirichandra *et al.* 2009), koji učestvuju u procesu regulacije otvorenosti stominog aparata kod *A. thaliana* i regulaciji ekspresije gena u stresu (Mittler & Blumwald 2015).

Pored detektovanog  $\cdot\text{OH}$  radikala, kod sve tri ispitivane vrste mahovina detektovan je Asc<sup>•</sup> u prisustvu ABA. Ovakvi rezultati ukazuju da ABA povećava aktivnost enzima askorbat-glutatskog ciklusa ili da je askorbat bitna komponenta koja se akumulira usled gajenja biljaka na hranljivoj podlozi sa dodatkom ABA. Ono što je pokazano u ćelijskim zidovima je da se ukoliko se doda egzogeno askorbat smanjuje DEPMPO/OOH adukt, što ukazuje na njegovu antioksidativnu aktivnost (Veljović-Jovanović *et al.* 2005).

Većina istraživanja se zasniva na izolovanim membranama ili ćelijskim zidovima biljaka pri čemu se razjašnjava produkcija i poreklo ROS. U ovoj doktorskoj disertaciji je prvi put ispitivana produkcija ROS na celokupnim biljkama, na živom materijalu. Sa druge strane, istraživanja koja se sprovode na ekstraktima biljaka pretežno ukazuju na antioksidativnu sposobnost da se uklone radikalske forme od strane biljke. Pokazano je da ekstrakt mahovine *Rhodobryum ontariense* ima izrazitu antioksidativnu sposobnost za uklanjanje  $\cdot\text{OH}$  radikala,  $\cdot\text{DPPH}$  radikala i  $\cdot\text{NO}$  radikala. Međutim, s obzirom na to da se ne nalazi velika količina fenolnih jedinjenja kod ove vrste, već ugljenih hidrata (Pejin *et al.* 2012a), pretpostavlja se da su u ovom slučaju šećeri glavni skevendžeri radikala, primarno  $\cdot\text{OH}$  radikala (Pejin *et al.* 2014). Fosforilovana glukoza može učestvovati u uklanjanju  $\cdot\text{OH}$  radikala (Spasojević *et al.* 2009), ali i fruktooligosaharid 1-kestoza i nistoza (Pejin *et al.* 2014). Poznato je da se šećeri kao što su saharoza, trehaloza, rafinozni šećeri i fruktani akumuliraju kod biljaka usled umerenog stresa kada je rastenje i razviće inhibirano, ali fotosinteza nije (De Roover *et al.* 2000). Pored toga što stabilizuju membrane i sprečavaju peroksidaciju, oni mogu imati i ulogu kao pravi skevedžeri radikala. Na primer, fruktan može „hvatati“  $\cdot\text{OH}$  radikale i preći u fruktan radikal, koji se uz pomoć fenolnih jedinjenja može regenerisati u fruktan u tonoplastu ćelije (Peshev & Van den Ende 2012). Takođe, šećeri mogu učestvovati kao regulatorni molekuli kontrolišući ekspresiju stres-responsivnih gena tokom stresa ili rasteња i razvića biljaka (Couée *et al.* 2006). Pokazano je da glukoza specifično dovodi do ekspresije gena za halkon sintazu, enzim koji učestvuje u sintezi antocijanina i SOD (Koch 1996; Couée *et al.* 2006). Način na koji šećeri konkretno dovode do antioksidativne zaštite nije u potpunosti poznat, ali je izvesno da je odnos heksoza i saharoze bitan parametar od koga zavise metaboličke promene (Xiang *et al.* 2011; Peshev & Van den Ende 2012). U eksperimentima sa duvanom potvrđena je sposobnost uklanjanja radikala za šećerne alkohole manitol, inozitol i sorbitol, kao i za trehalozu (Stoyanova *et al.* 2011).

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu eksperimentalnih podataka, analiza i dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Briofite poseduju rezistenciju, odnosno izvesnu dozu tolerancije na stres izazvan NaCl, kako fakultativne brio-halofitne mahovine (*E. hungaricus* i *H. heimii*), tako i one koje ne pokazuju takve ekološke preferencijale (*P. patens*).
- Mehanizmi tolerancije i rezistencije između tri istraživane vrste nisu univerzalni i premda postoje sličnosti, postoje i znantne razike među njima.
- Predtretman apscisinskom kiselinom olakšava preživljavanje u uslovima stresa izazvanog NaCl i povećava tolerantnost na NaCl kod istraživanih briofita.
- Kod brio-halofita ABA je pozitivno uticala na formiranje tmema i brahicita, organa za preživljavanje.
- Promene u fotosintetskom aparatu, odnosno sadržaju i odnosu hlorfila u uslovima stresa izazvanog NaCl nisu univerzalne, već su specifične za svaku od ispitivanih vrsta briofita.
- Egzogeno primenjena ABA je negativno korelisana sa sintezom fotosintetskih pigmenata.
- Sadržaj fenolnih jedinjenja je karakterističan za svaku vrstu, ali je i u korelaciji sa odgovorom na stres izazvan sa NaCl, odnosno kod funaroidnih mahovina više varira, dok je kod *H. heimii* stabilniji u uslovima stresa sa NaCl.
- Fenolna jedinjenja se pretežno sintetišu i akumuliraju u citoplazmi ćelija protoneme i filoida kod sve tri ispitivane vrste briofita, dok ABA utiče na njihovu transpoziciju u ćelijske zidove, posebno kod funaroidnih mahovina.
- Terpenoidi su uglavnom zastupljeni u citoplazmi ćelija protoneme brio-halofita i promena njihove koncentracije je *species*-specflična usled jačine stresa izazvanog sa NaCl, pri čemu se mogu detektovati u većoj meri i u ćelijama filoida.
- Egzogeno dodata ABA je u pozitivnoj korelaciji sa povećanjem terpenoida kod funaroidnih mahovina, a nasuprot tome kod vrste *H. heimii* utiče na smanjenje i promenu sastava terpenoida, na šta ukazuju histohemijske analize.
- Ispitivane briofite se odlikuju visokim antioksidativnim kapacitetom, čiji se parametri ne menjaju značajno usled predtretmana ABA, što ukazuje da nema direktne korelacije egzogeno dodate ABA i antioksidativne aktivnosti kod testiranih mahovina.
- Šećeri i šećerni alkoholi se primarno detektuju i u citoplazmi i ćelijskom zidu ćelija protoneme i filoda, a njihov sadržaj je u korelaciji sa jačinom stresa izazvanog sa NaCl i specifičan je za vrstu. Analize šećera su pokazale da se izomaltoza izdvaja kao specifični šećer kod brio-halofita i da se njen sadržaj povećava u uslovima stresa izazvanog sa NaCl.
- ABA dovodi do smanjenja koncentracije ukupnih šećera kod sve tri ispitivane vrste briofita. Sporadično, zapaža se povećanje koncentracije određenih tipova šećera, što je karakteristično za vrstu.
- Generalno, metaboliti se primarno detektuju u protonemalnim filamentima, a dugotrajni stres izazvan sa NaCl dovodi do njihove akumulacije i u citoplazmi filoida, dok egzogena ABA utiče na njihovu transpoziciju i u ćelijske zidove.
- Kod *P. patens* je identifikovana najveća količina hidroksil i askorbil radikala, dok se kod brio-halofita nivo produkcije radikala održava na relativno niskom nivou čak i u ekstremnom prisustvu NaCl.
- Predtretman ABA utiče na višestruko povećanje produkcije hidroksil radikala kod sve tri ispitivane vrste briofita, kao i pojave askorbil radikala kod brio-halofita.

## 7. LITERATURA

- Agati G, Azzarello E, Pollastri S & Tattini M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science* **196**: 67–76.
- Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G & Sharma S. 2010. Roles of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology* **30(3)**: 161-175.
- Ahmad P, Nabi G & Ashraf M. 2011. Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. & Cross.] plants can be alleviated by salicylic acid. *South African Journal of Botany* **77(1)**: 36-44.
- Allen JA, Cambers JL & Stine M. 1994. Prospects for increasing the salt tolerance of forest trees: a review. *Tree Physiology* **14**: 843-853.
- Amirjani M. 2011. Effect of salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity of rice. *International Journal of Botany* **7(1)**: 73-81.
- Arif MA, Hiss M, Tomek M, Busch H, Meyberg R, Tintelnot S, Reski R, Rensing SA & Frank W. 2019. ABA-induced vegetative diaspore formation in *Physcomitrella patens*. *Frontiers in Plant Science* **10**: 315.
- Arora A, Byrem TM, Nair G & Strasburg GM. 2000. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373(1)**: 102-109.
- Asakawa Y. 2007. Biologically active compounds from bryophytes. *Pure and Applied Chemistry* **79(4)**: 557–580.
- Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F, Toyota M, Hashimoto T, Tori M, Fukuyama Y & Harinantenaina L. 2009. Bryophytes: bio- and chemical diversity, bioactivity and chemosystematics. *Heterocycles* **77(1)**: 99-150.
- Asakawa Y. 2011. Bryophytes: chemical diversity, synthesis and biotechnology. A review. *Flavour and Fragrance Journal* **26(5)**: 318-320.
- Asakawa Y, Ludwiczuk A & Nagashima F. 2013. Introduction. In: Chemical constituents of bryophytes, 95, pp. 1-796. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer, Vienna.
- Asakawa Y & Ludwiczuk A. 2018. Chemical constituents of bryophytes: structural and biological activity. *Journal of Natural Products* **81(3)**: 641-660.
- Ashraf M & Foolad MR. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* **59(2)**: 206-216.
- Askerlund P, Larsson C, Widell S & Møller IM. 1987. NAD(P)H oxidase and peroxidase activities in purified plasma membranes from cauliflower inflorescences. *Physiologia Plantarum* **71(1)**: 9–19.
- Aslam R, Nazish B, Nabgha A, Maleeha M & Waseem S. 2011. A critical review on halophytes: salt tolerant plants. *Journal of Medicinal Plants Research* **5(33)**: 7108-7118.
- Aslanbaba B, Yilmaz S & Tonguc-Yayinta Ö. 2017. Total phenol content and antioxidant activity of mosses from Yenice forest (Ida mountain). *Journal of Scientific Perspectives* **1(1)**: 1-12.
- Balibrea ME, Dell Amico J, Bolarin MC & Perez-Alfocea F. 2000. Carbon partitioning and sucrose metabolism in tomato plants growing under salinity. *Physiologia Plantarum* **110(4)**: 503-511.

- Bates JW. 1975. A quantitative investigation of saxicolous bryophyte and lichen vegetation of Cape Clear Island, County Cork. *Journal of Ecology* **63**(1): 143-162.
- Becker B & Marin B. 2009. Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Annals of Botany* **103**(7): 999-1004.
- Beckett RP, Csintalan Z & Tuba Z. 2000. ABA treatment increases both desiccation tolerance of photosynthesis, and non-photochemical quenching in the moss *Atrichum undulatum*. *Plant Ecology* **151**: 65-71.
- Beike AK, Jaeger C, Zink F, Decker EL & Reski R. 2014. High contents of very long-chain polyunsaturated fatty acids in different moss species. *Plant Cell Reports* **33**:245–254.
- Benito B & Rodríguez-Navarro A. 2003. Molecular cloning and characterization of a sodium-pump ATPase of the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* **36**(3): 382-389.
- Berland H, Albert NW, Stavland A, Jordheim M, McGhie TK, Zhou Y, Zhang H, Deroles SC, Schwinn KE, Jordan BR, Davies KM & Andersen, Ø. M. 2019. Auronidins are a previously unreported class of flavonoid pigments that challenges when anthocyanin biosynthesis evolved in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**(40): 20232–20239.
- Bhattarai HD, Paudel B, Lee HS, Lee YK & Yim JH. 2008. Antioxidant activity of *Sanionia uncinata*, a polar moss species from King George Island, Antarctica. *Phytotherapy Research* **22**(12): 1635-1639.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 1199-1200.
- Boerner RE & Forman RTT. 1975. Salt spray and coastal dune mosses. *Bryologist* **78**: 57-63.
- Bogdanović M, Sabovljević A, Sabovljević M, Dragičević M, Platiša-Popović J & Grubišić D. 2009a. Effects of NaCl on chlorophyll and protein content and antioxidant enzymes activity in two bryophyte species – *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. and *Marchantia polymorpha* L. In: 5th Balkan Botanical Congress, Belgrade, Serbia, September 7-11. Book of Abstracts, pp.87.
- Bogdanović M, Sabovljević M & Sabovljević A. 2009b. The influence of gypsiferous substrata on bryophyte growth: are there obligatory gypsophilous bryophytes? *Botanica Serbica* **33**: 75-82.
- Bogdanović M, Ilić M, Živković S, Sabovljević A, Grubišić D & Sabovljević M. 2011. Comparative study on the effects of NaCl on selected moss and fern representatives. *Australian Journal of Botany* **59**(8): 734-740.
- Bohnert HJ & Jensen RG. 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* **14**(3): 89-97.
- Bohnert HJ & Shen B. 1999. Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae* **78**: 237-260.
- Bopp M. 1977. Aspekte der physiologie und der phylogenie der hormonalen regulation der knospenbildung in laubmoosen. *Bryophytorum Bibliotheca* **13**: 777-783.
- Bopp M, Quader H, Thoni C, Sawidis T & Schnepf E. 1991. Filament disruption in *Funaria protonemata*: formation and disintegration of tmema cells. *Journal of Plant Physiology* **137**(3): 273– 284.

- Bopp M & Werner O. 1993. Abscisic acid and desiccation tolerance in mosses. *Botanica Acta* **106(2)**: 103-106.
- Borghesi E, González-Miret LM, Escudero-Gilete LM, Malorgio F, Heredia FJ & Meléndez-Martínez AJ. 2011. Effects of salinity stress on carotenoids, anthocyanins and color diverse tomato genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59(21)**: 11676-11682.
- Borkowski T, Szymusia H, Gliszczyńska-Świgło A, Rietjens IMCM & Tyrakowska B. 2005. Radical scavenging capacity of wine anthocyanins is strongly pH-dependent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53(14)**: 5526–5534.
- Bray EA. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2(2)**: 48-54.
- Buda GJ, Barnes WJ, Fich EA, Park S, Yeats TH, Zhao L, Domozych DS & Rose JKC. 2013. An ATP binding cassette transporter is required for cuticular wax deposition and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* **25(10)**: 4000–4013.
- Carillo P, Annunziata MG, Pontecorvo G, Fuggi A & Woodrow P. 2011. Salinity stress and salt tolerance. In: Shanker AK and Venkateswarlu B (eds.), pp. 21-37. Abiotic stress plants – mechanisms and adaptations, InTech, available from: <http://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-in-plants-mechanisms-and-adaptations/salinity-stress-and-salt-tolerance>
- Carpita NC & Gibeaut DM. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants consistency of molecular structures with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* **3(1)**: 1-30.
- Chang CL, Lin CS & Lai GH. 2012. Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, pp.8.
- Chaves MM, Flexas J & Pinheiro C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103(4)**: 551-560.
- Cheeseman J. 1988. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology* **87(3)**: 547-550.
- Chen S & Schopfer P. 1999. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry* **206(3)**: 726-735.
- Chen F, Ludwiczuk A, Wei G, Chen X, Crandall-Stotler B & Bowman JL. 2018. Terpenoid secondary metabolites in bryophytes: chemical diversity, biosynthesis and biological functions. *Critical Reviews in Plant Sciences* **37(2-3)**: 210-231.
- Cheng A-X, Lou Y-G, Mao Y-B, Lu S, Wang L-J & Chen X-Y. 2007. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology* **49(2)**: 179–186.
- Chiou SY, Su WW & Su YC. 2001. Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture. *Journal of Biotechnology* **85(3)**: 247–257.
- Chobot V, Kubicová L, Nabbout S, Jahodář L & Vytlačilova J. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activities of five moss species. *Fitoterapia* **77(7-8)**: 598-600.
- Chobot V, Kubicová L, Nabbout S, Jahodář L & Hadacek F. 2008. Evaluation of antioxidant activity of some common mosses. *Zeitschrift fur Naturforsch C – A Journal of Biosciences* **63(7-8)**: 476–482.
- Chopra RN & Kumra PK. 1988. Biology of bryophytes. New Delhi: New Age International (P) Ltd.

- Chopra RN & Kapur A. 1989. Effect of abscisic acid and kinetin on protonemal differentiation in *Timmiella anomala*. *Plant Science* **61(2)**: 203-206.
- Chopra RN & Mehta P. 1987. Effect of some known growth regulators on growth and fertility in male clones of the moss *Microdus brasiliensis* (Dub.) Ther. *Journal of Experimental Botany* **38(187)**: 331-339.
- Christie WW & Han X. 2012. Lipid Analysis. 4<sup>th</sup> edition, pp. 3–19, Elsevier; Amsterdam, The Netherlands.
- Christianson ML. 2000. ABA prevents the second cytokinin-mediated event during the induction of shoot buds in the moss *Funaria hygrometrica*. *American Journal of Botany* **87(10)**: 1540-1545.
- Chung JS, Zhu JK, Bressan RA, Hasagawa PM & Shi H. 2008. Reactive oxygen species mediate Na<sup>+</sup>-induced *SOS1* mRNA stability in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **53(3)**: 554-565.
- Chutipaijit S, Cha-Um S & Somopornpailin K. 2011. High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp. indica. *Australian Journal of Crop Science* **5(10)**: 1191-1198.
- Close TJ. 1997. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* **100(2)**: 291-296.
- Combrinck S, Du Plooy GW, McCrindle RI & Botha BM. 2007. Morphology and histochemistry of the glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of Botany* **99(6)**: 1111-1119.
- Cooper ED, Henwood MJ & Brown EA. 2012. Are the liverworts really that old? Cretaceous origins and Cenozoic diversifications in Lepidoziaceae reflect a recurrent theme in liverwort evolution. *Biological Journal of Linnean Society* **107(2)**: 425-441.
- Cordoba-Pedregosa MC, Gonzalez-Reyes JA, Canadillas MdS, Navas P & Cordoba F. 1996. Role of apoplastic and cell-wall peroxidases on stimulation of root elongation by ascorbate. *Plant Physiology* **112(3)**: 1119-1125.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G & El Amrani A. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and response to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **57(3)**: 449-459.
- Cove D. 2005. The moss *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics* **39**: 339-358.
- Crandall-Stotler BJ, Bartholomew-Began SE. 2007. Morphology of mosses (phylum Bryophyta). *Flora of North America* **(27)**: 3-13.
- Crozier A, Jaganath IB & Clifford MN. 2006. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: Crozier A, Ashihara H (eds), pp. 1–24. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet, Blackwell, Oxford.
- Crum HA. 1991. Liverworts and hornworts of Southern Michigan. University of Michigan Herbarium, Ann Arbor, MI, pp. 233.
- Crum HA. 2001. Structural diversity of bryophytes. The University of Michigan Herbarium, Ann Arbor, MI, pp. 379.
- Cuming AC, Cho SH, Kamisugi Y, Graham H & Quatrano RS. 2007. Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss, *Physcomitrella patens*. *New Phytologist* **176(2)**: 275– 287.



- Cushman JC. 2001. Osmoregulation in plants: implications for agriculture. *American Zoologist* **41**: 758-769.
- Ćosić MV, Vujičić MM, Lončarević I, Sabovljević AD & Sabovljević MS. 2018. Does ABA pretreatment affect ecophysiological status of bryo-halophyte *Entosthodon hungaricus* during salt stress. 3rd International Conference on Plant Biology and 22nd SPPC Meeting. Belgrade, Serbia, 9-12.6.2018. Book of Abstracts pp.56.
- Ćosić MV, Vujičić MM, Sabovljević MS & Sabovljević AD. 2019. What do we know about salt stress in bryophytes? *Plant Biosystems* **153(3)**: 478-489.
- D'Souza JS & Johri MM. 2002. ABA and NaCl activate myelin basic protein kinase in the chloronema cells of the moss *Funaria hygrometrica*. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 17-24.
- Danquah A, de Zelicourt A, Colcombet J & Hirt H. 2013. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances* **32(1)**: 40-52.
- Dapkevicius A, Venskutonis R, van Beek TA & Linssen JPH. 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77(1)**: 140-146.
- Das K & Roychoudhury A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* **2(53)**: 1-13.
- David R & Carde JP. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du réactif Nadi. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, 258, pp. 1338-1340.
- de Amorim EC, de Castro VDA, de Melo JG, Corrêa AJC, Sobrinho TDSP. 2012. Standard operating procedures (SOP) for the spectrophotometric determination of phenolic compounds contained in plant samples. In: Latest research into quality control. InTech
- Decker EL, Frank W, Sarnighausen E & Reski R. 2006. Moss systems biology en route: phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biology* **8(3)**: 397-405.
- Decker EL & Reski R. 2007. Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology* **18(5)**: 393-398.
- Delfine S, Alvino A, Villani MC & Loreto F. 1999. Restriction to carbon dioxide conductance and photosynthesis in spinach leaves recovering from salt stress. *Plant Physiology* **119(3)**: 1101-1106.
- Delmas F, Sankaranarayanan S, Deb S, Widdup E, Bournonville C, Bollier N, Northey JGB, McCourt P, Samuel MA. 2013. ABI3 controls embryo degreening through Mendel's I locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110(40)**: E3888-E3894.
- Dembitsky VM. 1993. Lipids of bryophytes. *Progress in Lipid Research* **32(3)**: 381-356.
- Dietz KJ, Tavakoli N, Kluge C, Mimura T, Sharma SS, Harris GC, Chardonnens AN & Golldack D. 2001. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany* **52(363)**: 1969-1980.

- Drew DP, Hrmova M, Lunde C, Jacobs AK, Tester M & Fincher GB. 2011. Structural and functional analyses of PpENA1 provide insights into cation binding by type IID P-type ATPases in lower plants and fungi. *Biochimica et Biophysica Acta* **1808(6)**: 1483-1492.
- Edelmann HG, Neinhuis C, Jarvis M, Evans B, Fischer E & Barthlott W. 1998. Ultrastructure and chemistry of the cell wall of the moss *Rhacocarpus purpurascens* (Rhacocarpaceae): A puzzling architecture among plants. *Planta* **206**: 315-321.
- El-Shintinawy F & El-Shourbagy MN. 2001. Alleviation of changes in protein metabolism in NaCl-stressed wheat seedlings by thiamine. *Biologia Plantarum* **44(4)**: 541-545.
- Erturk O, Sahin H, Erturk EY, Hotaman HE, Koz B & Ozdemir O. 2015. The antimicrobial and antioxidant activities of extracts obtained from some moss species in Turkey. *Herba Polonica* **61(4)**: 52-65.
- Erxleben A, Gessler A, Vervilet-Scheebaum M & Reski R. 2012. Metabolite profiling of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionary conservation of osmoprotective substances. *Plant Cell Reports* **31(2)**: 427-436.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T & Steber C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 387-415.
- Flowers TJ, Hajibagheri MA, Clipson NJW. 1986. Halophytes. *Quarterly Review of Biology* **61(3)**: 313-337.
- Flowers TJ. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **55**: 307-319.
- Flowers TJ, Yeo AR. 1986. Ion relations of plants under drought and salinity. *Australian Journal of Plant Physiology* **13(1)**: 75-91.
- Flowers TJ & Colmer TD. 2015. Plant salt tolerance: adaptations in halophytes. *Annals of Botany* **115(3)**: 327-331.
- Fraile-Escanciano A, Kamisugi Y, Cuming AC, Rodríguez-Navarro A & Benito B. 2010. The SOS1 transporter of *Physcomitrella patens* mediates sodium efflux in planta. *New Phytologist* **188(3)**: 750-761.
- França MB, Panek AD & Eleutherio EC. 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology* **146(4)**: 621-631.
- Frank W, Ratnadewi D & Reski R. 2005. *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta* **220(3)**: 384-394.
- Frank W, Munnik T, Kerkmann K, Salamini F & Bartels D. 2000. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *The Plant Cell* **12(1)**: 111-123.
- Frey W & Kürschner H. 2011. Asexual reproduction, habitat colonization and habitat maintenance in bryophytes. *Flora* **206(3)**: 173-184.
- Fry SC. 1998. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal* **332(Pt 2)**: 507-515.
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K. 2005. AREB1 is a transcription activator of novel

- ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell* **17(12)**: 3470–3488.
- Furuki T & Dalton PJ. 2008. *Vandiemena ratkowskiana* Hewson (Marchantiophyta): a revised description and reassessment of its taxonomic status. *Journal of Bryology* **30(1)**: 48-54.
- Gadallah MAA. 1999. Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* responses to salt stress. *Biologia Plantarum* **42(2)**: 249-257.
- Garbary DJ, Renzaglia KS & Duckett JG. 1993. The phylogeny of land plants: a cladistic analysis based on male gametogenesis. *Plant Systematics and Evolution* **188**: 237-269.
- Gathori D & Chaturvedi P. 2019. Bryophytes: a potential source of antioxidants. In: Bryophytes DOI: 10.5772/intechopen.84587
- Girke T, Schmidt H, Zähringer U, Reski R & Heinz E. 1998. Identification of a novel delta 6 acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* **15(1)**: 39-48.
- Ghorai N, Chakraborty S, Guichait S, Saha SK & Biswas S. 2012. Estimation of total terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, linalool as standard reagent. *Protocol Exchange*: preprint
- Glenn EP & Brown JJ. 1999. Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18(2)**: 227-255.
- Glime JM. 2007. Bryophyte ecology. Volume 1: Physiological Ecology. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. Accessed on 26<sup>th</sup> January 2021 at <http://www.bryoecol.mtu.edu/>.
- Goode JA, Stead AD & Duckett JG. 1993. Redifferentiation of moss protonemata: an experimental and immunofluorescence study of brood cell formation. *Canadian Journal of Botany* **71(11)**: 1510–1519.
- Goffinet B & Shaw AJ. 2009. Bryophyte biology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 476.
- Gomes MAC, Suzuki MS, da Cunha M & Tullii CF. 2011. Effect of salt stress on nutrient concentration, photosynthetic pigments, proline and foliar morphology of *Salvinia auriculata* Aubl. *Acta Limnologica Brasiliensia* **23(2)**: 164-176.
- Goyal K, Walton LJ & Tunnacliffe A. 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *The Biochemical Journal* **388(Pt 1)**: 151-157.
- Grandstein SR, Allen NS & Churchill PS. 2001. Guide to the bryophytes of tropical America. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **86**: 1-577.
- Grigore MN, Villanueva M, Boscaiu M & Vicente O. 2012. Do halophytes really require salts for their growth and development? An experimental approach. *Notulae Scientia Biologicae* **4(2)**: 23-29.
- Gupta B & Huang B. 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*. **2014**: 701596.
- Gupta AK & Kaur N. 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences* **30(5)**: 761–776.

- Guschina IA, Harwood JL, Smith M & Beckett RP. 2002. Abscisic acid modifies the changes in lipid brought about by water stress in the moss *Atrichum androgynum*. *New Phytologist* **156**(2): 255-264.
- Hadži-Tašković Šukalović V, Vuletić M, Veljović-Jovanović S & Vučinić Ž. 2010. The effects of manganese and copper *in vitro* and *in vivo* on peroxidase catalytic cycles. *Journal of Plant Physiology* **167**(18): 1550-1557.
- Halliwell B. 1977. Generation of hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals during the oxidation of dihydroxyfumaric acid by peroxidase. *Biochemical Journal* **163**(3): 441-448.
- Hara M, Terashima S, Fukaya T & Kuboi T. 2003. Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta* **217**: 290-298.
- Hardie DG. 1999. Plant protein serine/threonine kinases: Classification and functions. *Annual Review of Plant Physiol and Plant Molecular Biology* **50**: 97-131.
- Hare PD, Cress WA & Van-Staden J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* **21**(6): 535-554.
- Hartung W, Hellwege EM & Volk OH. 1994. The function of abscisic acid in bryophytes. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **76**: 59-65.
- Hayashi K, Kawaide H, Notomi M, Sakigi Y, Matsuo A & Nozaki H. 2006. Identification and functional analysis of bifunctional ent-kaurene synthase from the moss *Physcomitrella patens*. *FEBS Letters* **580**(26): 6175-6181.
- Héban C. 1977. The conducting tissues of bryophytes. J. Cramer, Lehre, Germany pp. 157 + 80 plates.
- Hellwege EM, Volk OH & Hartung W. 1992. A physiological role of abscisic acid in the liverwort *Riccia fluitans* L. *Journal of Plant Physiology* **140**(5): 553-556.
- Hellwege EM, Dietz KJ, Volk OH & Hartung W. 1994. Abscisic acid and the induction of desiccation tolerance in the extremely xerophilic liverwort *Exomotheca holstii*. *Planta* **194**: 525-531.
- Herben T. 1994. The role of reproduction for persistence of bryophyte populations in transient and stable habitats. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **76**: 115-126.
- Hilal M, Parrado MF, Rosa M, Gallardo M, Orce L, Massa ED, González JA & Prado FE. 2004. Epidermal lignin deposition in quinoa cotyledons in response to UV-B radiation. *Photochemistry and Photobiology* **79**(2): 205-210.
- Hinault MP, Ben-Zvi A & Goloubinoff P. 2006. Chaperones and proteases: Cellular fold-controlling factors of proteins in neurodegenerative diseases and aging. *Journal of Molecular Neuroscience* **30**: 249-265.
- Hohe A, Rensing SA, Mildner M, Lang D & Reski R. 2002. Day Length and Temperature Strongly Influence Sexual Reproduction and Expression of a Novel MADS-Box Gene in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biology* **4**(5): 595-602.
- Holmström KO, Somersalo S, Mandal A, Pavla TE & Welin B. 2000. Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany* **51**(434): 177-185.
- Hooijmaijers C. 2008. Membrane integrity, oxidative damage and chlorophyll fluorescence during dehydration of the thalloid liverwort *Monoclea forsteri* Hook. *Journal of Bryology* **30**(3): 217-222.

- Horn A, Pascal A, Lončarević I, Volpatto Marques R, Lu Y, Miguel S, Bourgaud F, Thorsteinsdóttir M, Cronberg N, Becker JD, Reski R & Simonsen HT. 2021. Natural products from bryophytes: from basic biology to biotechnological applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* **40(3)**: 191-217.
- Huang AHC. 2018. Plant lipid droplets and their associated proteins: potential for rapid advances. *Plant Physiology* **176(3)**: 1894-1918.
- Hueber FM. 1961. *Hepaticites devonicus*, a new fossil liverwort from the Devonian of New York. *Annals of Missouri Botanical Garden* **48(2)**: 125-131.
- Isayenkov SV & Maathuis FJM. 2019. Plant salinity stress: many unanswered questions remain. *Frontiers in Plant Science* **10**: 80.
- Ishitani M, Xiong L, Stevenson B & Zhu JK. 1997. Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transcription in *Arabidopsis*: interaction and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *The Plant Cell* **9(11)**: 1935-1949.
- Jensen WA. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco, CA, Freeman.
- Jocković N, Andrade PB, Valentão P & Sabovljević M. 2008. HPLC-PAD of phenolics in bryophytes *Lunularia cruciata*, *Brachytheciastrum velutinum* and *Kindbergia praelonga*. *Journal of Serbian Chemical Society* **73(12)**: 1161-1167.
- Joganath IB & Crozier A. 2010. Dietary flavonoids and phenolic compounds. In: Fraga G (ed.), Plant phenolics and human health, pp. 1–50. Wiley, Hoboken.
- Johansen DA. 1940. Plant microtechnique. New York, London, McGraw-Hill Book.
- Jungklang J, Usui K & Matsumoto H. 2003. Differences in physiological responses to NaCl between salt-tolerant *Sesbania rostrata* Brem. & Obrem. and non-tolerant *Phaseolus vulgaris* L. *Weed Biology and Management* **3(1)**: 21-27.
- Keunen E, Remans T, Bohler S, Vangronsveld J & Cuyper A. 2011. Metal-induced oxidative stress and plant mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences* **12(10)**: 6894-6918.
- Khan NA. 2003. NaCl-inhibited chlorophyll synthesis and associated changes in ethylene evolution and antioxidative enzyme activities in wheat. *Biologia Plantarum* **47(3)**: 437-440.
- Khandelwal A, Cho SH, Marella H, Sakata Y, Perroud P-F, Pan A & Quatrano RS. 2010. Role of ABA and ABI3 in desiccation tolerance. *Science* **327(5965)**: 546.
- Khaleghi E, Arzani K, Moallemi N & Barzegar M. 2012. Evaluation of chlorophyll content and chlorophyll fluorescence parameters and relationships between chlorophyll a, b and chlorophyll content index under water stress in *Olea europea* cv. Dezful. *World Academy of Science, Engineering and Technology* **6**: 636-639.
- Khelil A, Menu T & Richars T. 2007. Adaptive response to salt involving carbohydrate metabolism in leaves of salt-sensitive tomato cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* **45(8)**: 551-559.
- Kim HJ, Fonseca JM, Choi JH, Kubota C & Kwon DY. 2008. Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of Romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56(10)**: 3772-3776.
- Kim TH, Bohmer M, Hu H, Nishimura N & Schroeder JI. 2010. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signalling. *Annual Review in Plant Biology* **61**: 561-591.

- Kirakosyan A, Kaufman P, Warber S, Zick S, Aaronson K, Bolling S, Chang SC. 2004. Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. *Physiologia Plantarum* **121(2)**: 182–186.
- Klavina L. 2014. Polysaccharides from Lower Plants: Bryophytes. In: Ramawat KG, Mérillon JM, (eds.) Polysaccharides, pp. 146–158, Berlin: Springer.
- Klavina L. 2018. Composition of mosses, their metabolites and environmental stress impacts. Doctoral thesis. University of Latvia, Faculty of geography and earth sciences.
- Kline KG, Sussman MR & Jones AM. 2010. Abscisic acid receptors. *Plant Physiology* **154(2)**: 479–482.
- Knight CD, Sehgal A, Atwal K, Wallace JC, Cove DJ, Coates D, Quatrano RS, Bahadur S, Stockley PG & Cuming AC. 1995. Molecular responses to abscisic acid and stress are conserved between moss and cereals. *The Plant Cell* **7(5)**: 499–506.
- Koch KE. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 509–540.
- Komatsu K, Nishikawa Y, Ohtsuka T, Taji T, Quatrano RS, Tanaka S & Sakata Y. 2009. Functional analyses of the ABI1-related protein phosphatase type 2C reveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between Arabidopsis and the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Molecular Biology* **70(3)**: 327–340.
- Koster KL, Balsamo RA, Espinoza C & Oliver MJ. 2010. Desiccation sensitivity and tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: assessing limits and damage. *Plant Growth Regulation* **62**: 293–302.
- Kovacs D, Kalmar E, Torok Z & Tompa P. 2008. Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiology* **147(1)**: 381–390.
- Kroemer K, Reski R & Frank W. 2004. Abiotic stress response in the moss *Physcomitrella patens*: evidence for an evolutionary alteration in signaling pathways in land plants. *Plant Cell Reports* **22(11)**: 864–870.
- Krzaczkowski L, Wright M & Gairin JE. 2008. Bryophytes, a potential source of drugs for tomorrow's medicine? *Medicine Sciences* **24(11)**: 947–953.
- Kukavica B, Mojović M, Vučinić Ž, Maksimović V, Takahama U & Veljovi-Jovanović S. 2009. Generation of hydroxyl radical in isolated pea root cell wall, and the role of cell wall-bound peroxidase, Mn-SOD and phenolics in their production. *Plant and Cell Physiology* **50(2)**: 304–317.
- Kuźniak E & Urbanek H. 2000. The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiologiae Plantarum* **22(2)**: 195–203.
- Lang D, Zimmer AD, Rensing SA & Reski, R. 2008. Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. *Trends in Plant Science* **13(10)**: 542–549.
- Leach W. 1931. On the importance of some mosses as pioneers on unstable soils. *Journal of Ecology* **19(1)**: 98–102.
- Lemańska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zieliński R, Soffers A & Ritjens IMCM. 2001. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxy flavones. *Free Radical Biology and Medicine* **31**: 869–881.



- Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**: 50-382
- Lima MGS, Lopes NF, Bacarin MA & Mendes CR. 2004. Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos e prolina em folhas de arroz. *Bragantia* **63(3)**: 335-340.
- Limpens J, Berendse F, Blodau C, Canadell JG, Freeman C, Holden J, Roulet N, Rydin H & Schaepman-Strub G. 2008. Peatlands and carbon cycle: from local process to global implications – a synthesis. *Biogeosciences* **5(5)**: 1475-1491.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell* **10(8)**: 1391-1406.
- Liu N, Zhong NQ, Wang GL, Li LJ, Liu XL, He YK & Xia GX. 2007. Cloning and functional characterization of *PpDBF1* gene encoding a DRE-binding transcriptional factor from *Physcomitrella patens*. *Planta* **226(4)**: 827-838.
- Liu S, Wang J, Cong B, Huang X, Chen K & Zhang P. 2014. Characterization and expression analysis of a mitochondrial heat-shock protein 70 gene from the Antarctic moss *Pohlia nutans*. *Polar Biology* **37**: 1145–1155.
- Liszakay A, Kenk B, Schopfer P. 2003. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* **217(4)**: 658–667.
- Longton RE. 1988. Adaptations and strategies of polar bryophytes. *Botanical Journal of the Linnean Society* **98(3)**: 253-268.
- Longton RE. 1992. The role of bryophytes and lichens in terrestrial ecosystems. In: Farmer AM, Bates JW (Eds.), *Bryophytes in a changing environment*, pp. 32-76, Oxford, Calerndon Press.
- Longton RE & Schuster RM. 1983. Reproductive biology. In: Schuster, R. M. (ed.): *New Manual of Bryology 1. The Journal of Hattori Botanical Laboratory*, pp. 386-462.
- Lu C & Vonshak A. 1999. Characterization of PSII photochemistry in salt-adapted cells of cyanobacterium *Spirulina platensis*. *New Phytologist* **141(2)**: 231-239.
- Lu Y, Eiriksson FF, Thorsteinsdóttir & Simonsen HT. 2019. Valuable fatty acids in bryophytes – production, biosynthesis, analysis and applicatons. *Plants* **8(11)**: 524.
- Ludwiczuk A & Asakawa Y. 2019. Bryophytes as a source of bioactive volatile terpenoids – A review. *Food and Chemical Toxicology* **132**: 1-11.
- Lunde C, Drew DP, Javobs AK & Tester M. 2007. Exclusion of Na<sup>+</sup> via sodium ATPase PpENA1 ensure normal growth of *Physcomitrella patens* under moderate salt stress. *Plant Physiology* **144(4)**: 1786-1796.
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A & Grill E. 2009. Regulators of PP<sub>2</sub>C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324(5930)**: 1064-1068.
- Maathuis FJM. 2014. Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. *Journal of Experimental Botany* **65(3)**: 849–858.
- Mahajan S, Pandey GK & Tuteja N. 2008. Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **471(2)**: 146-158.

- Mäkelä P, Kärkkäinen J & Somersalo S. 2000. Effect of glycine-betaine on chloroplast ultrastructure, chlorophyll and protein content, and RuBPCO activities in tomato grown under drought or salinity. *Biologia Plantarum* **43(3)**: 471-475.
- Maksimova V, Klavina L, Bikovens O, Zicmanis A & Purmalis O. 2013. Structural characterization and chemical classification of some bryophytes found in Latvia. *Chemistry and Biodiversity* **10(7)**: 1284-1294.
- Mallón R, Reinoso J, Rodríguez-Oubiña J & González ML. 2006. *In vitro* development of vegetative propagules in *Splachnum ampullaceum*: brood cells and chloronematal bulbils. *The Bryologist* **109(2)**: 215–223.
- Mane AV, Karadge BA & Samant JS. 2010. Salinity induced changes in photosynthetic pigments and polyphenols of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **2(3)**: 338-347.
- Marchner H. 1995. Mineral nutrition of plants. 2nd ed. Boston (MA): Academic Press
- Marella HH, Sakata Y & Quatrano RS. 2006. Characterization and functional analysis of ABSCISIC ACID INSENSITIVE3-like genes from *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* **46(6)**: 1032–1044.
- Marschall M & Borbely P. 2011. Photosynthetic responses of the desiccation intolerant *Sphagnum angustifolium* in relation to increasing its desiccation tolerance by exogenous ABA. *Acta Biologica Szegedinensis* **55(1)**: 119-121.
- Marschall M & Laufer Z. 2002. Metabolic activity of *Sphagnum recurvum* under different environmental conditions. Proceedings of the 7<sup>th</sup> Hungarian Congress on Plant Physiology, Szeged, Hungary; pp. 247-248.
- Matsunaga T, Ishii T, Matsumoto S, Higuchi M, Darvill A, Albertsheim P & O’Neil MA. 2004. Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes and bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants. *Plant Physiology* **134(1)**: 339-351.
- Mayaba N, Beckett RP; Csintalan Z & Tuba Z. 2001. ABA increases the desiccation tolerance of photosynthesis in the afro-montane understory moss *Atrichum androgynum*. *Annals of Botany* **88(6)**: 1093-1100.
- Medina R, Johnson MG, Liu Y, Wickett NJ, Shaw JA & Goffinet B. 2019. Phylogenomic delineation of *Physcomitrium* (Bryophyta: Funariaceae) based on targeted sequencing of nuclear exons and their flanking regions rejects the retention of *Physcomitrella*, *Physcomitridium* and *Aphanorrhagma*. *Journal of Systematics and Evolution* **57(4)**: 404-417.
- Mehrotra R, Bhalothia P, Bansal P, Basantani MK, Bharti V & Mehrotra S. 2014. Abscisic acid and abiotic stress tolerance-different tiers of regulation. *Journal of Plant Physiology* **171(7)**: 486-496.
- Menand B, Calder G & Dolan L. 2007. Both chloronemal and caulonemal cells expand by tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* **58(7)**: 1843–1849.
- Mihailović V, Kreft S, Tavčar Benković E, Ivanović N & Stanković MS. 2016. Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species. *Industrial Crops and Products* **89**: 141-151.

- Mikami K & Hartman E. 2004. Lipid metabolism in mosses. In: Wood AJ, Oliver MJ, Cove DJ (eds.): New Frontiers in bryology: physiology, molecular biology and functional genomics. Springer, Dordrecht.
- Miladinova K, Ivanova K, Georgieva T, Geneva M & Markovska Y. 2013. The salinity effect on morphology and pigments content in three paulownia clones grown *ex vitro*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* **19(2)**: 52-56.
- Milošević S. 2010. Regeneracija i genetička transformacija biljaka *Impatiens walleriana* L. i *Impatiens hawkerii* Bull. u kulturi *in vitro*. Doktorska disertacija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Minami A, Nagao M, Asakawa K, Fujikawa S & Takezawa D. 2003. Abscisic acid-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes. *Journal of Plant Physiology* **160(5)**: 475-483.
- Minami A, Nagao M, Ikegami K, Koshiha T, Arakawa K, Fujikawa S & Takezawa D. 2005. Cold acclimation in bryophytes: low-temperature-induced freezing tolerance in *Physcomitrella patens* is associated with increases in expression levels of stress-related genes but not with increase in level of endogenous abscisic acid. *Planta* **220(3)**: 414-423.
- Mishler BD. 2001. The biology of bryophytes; bryophytes aren't just mall thracheophytes. *American Journal of Botany* **88(11)**: 2129-2131.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7(9)**:405-410.
- Mittler R & Blumwald E. 2015. The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *The Plant Cell* **27(1)**: 64-70.
- Mišić D, Šiler B, Filipović B, Popović Z, Živković S, Cvetić T & Mijović A. 2009. Rapid *in vitro* selection of salt tolerant genotypes of the potentially medicinal plant *Centaureum maritimum* (L.) Fritsch. *Archives of Biological Sciences* **61**: 57-59.
- Mogensen GS. 1981. The biological significance of morphological characters in bryophyta: The spore. *The Bryologist* **84(2)**: 187-207.
- Mojović M, Vuletić M & Bačić GG. 2005a. Detection of oxygen-centered radicals using EPR spin-trap DEPMPO. The effect of oxygen. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1048**: 471-475.
- Mojović M, Spasojević I, Vuletić M, Vučinić Ž & Bačić G. 2005b. An EPR spin-probe and spin-trap study of the free radicals produced by plant plasma membranes. *Journal of Serbian Chemical Society* **70(2)**: 177-186.
- Montenegro G, Portaluppi MC, Salas FA & Díaz MF. 2009. Biological properties of the Chilean native moss *Sphagnum magellanicum*. *Biological Research* **42(2)**: 233-237.
- Moran JF, Becana M, Iturbeotmaetxe I, Frechilla S, Klucas RV & Aparicotejo P. 1994. Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* **194**: 346-352.
- Muchate NS, Nikalje GC, Rajurkar NS, Suprasanna P & Nikam TD. 2016. Plant stress adaptive responses, tolerance mechanism and bioengineering for salt tolerance. *Botanical Review* **82(4)**: 371-406.
- Mues R & Zinsmeister HD. 1988. The chemotaxonomy of phenolic compounds in bryophytes. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **64**: 109-141.

- Munné-Bosch S. 2005. The role of alpha-tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* **162**(7): 743-748.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment* **25**(2): 239-250.
- Munns R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* **167**(3): 645-663.
- Munns R & Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Reviews of Plant Biology* **59**(1): 651-681.
- Muzolf M, Szymusiak H, Gliszczyn ska-Ś wigło A, Rietjens IM & Tyrakowska B. 2008. pH – dependent radical scavenging capacity of green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(3): 816–823.
- Nagae M, Nakata M, Takahashi Y. 2008. Identification of negative cis-actingelements in response to copper in the chloroplastic iron superoxide dismutase gene of the moss *Barbula unguiculata*. *Plant Physiology* **146**: 1687–1696.
- Nagao M, Oku K, Minami A, Mizuno K, Sakurai M, Arakawa K, Fujikawa S & Takezawa D. 2006. Accumulation of theandrose in association with development of freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry* **67**(7): 702–709.
- Nakata M, Watanabe Y, Sakurai Y, Hashimoto M, Matsuzaki Y, Takahashi Y & Satoh T. 2004. Gremin-like protein gene family of a moss, *Physcomitrella patens*, phylogenetically falls into two characteristic new clades. *Plant Molecular Biology* **56**: 381-395.
- Navarro JM, Flores P, Garrido C & Martinez V. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry* **96**(1): 66-73.
- Nerić V, Rajčić M, Vujičić M, Sabovljević M & Sabovljević A. 2014. NaCl effect on morphogenesis and photosynthetic pigment concentration in bryophytes *Atrichum undulatum* and *Polytrichum formosum* grown *in vitro*. The Third Balkan Scientific Conference on Biology, Plovdiv, Bulgaria, May 30 – June 1, 2014. Book of Abstracts, pp.72.
- Nerić V, Rajčić M, Vujičić M, Sabovljević M & Sabovljević A. 2015. The effect of long-term salt stress on different genotypes of the moss *Atrichum undulatum*. The Second International Conference on Plant Biology, the 21st Symposium of the Serbian Plant Physiology Society and COST action FA116 quality fruit workshop – joined meetings. June 17-20, 2015. Petnica, Serbia. Book of Abstracts: pp. 176.
- Nešković M, Konjević R & Ćulafić Lj. 2010. Fiziologija biljaka. Beograd: NNK International
- Niranjan A, Sahu V & Asthana AK. 2014. Phenolic compounds in thalloid liverworts growing in moss house. *Natural Products* **10**(1): 30-33.
- Nishiyama T, Fujita T, Shin IT, Seki M, Nishide H, Uchiyama I, Kamiya A, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K, Kohara Y & Hasebe M. 2003. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(13): 8007-8012.
- Nishiyama T, Wolf PG, Kugita M, Sinclair RB, Sugita M, Sugiura C, Wakasugi T, Yamada K, Yoshinaga K, Yamaguchi K, Ueda K & Hasebe M. 2004. Chloroplast phylogeny indicated that bryophytes are monophyletic. *Molecular Biology and Evolution* **21**(10): 1813-1819.

- Newton AE, Cox CJ, Duckett JG, Wheeler JA, Goffinet B, Hedderson TAJ & Mishler BD. 2000. Evolution of the major moss lineages: Phylogenetic analyses based on multiple gene sequences and morphology. *The Bryologist* **103(2)**: 187-211.
- Noctor G & Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology* **49**: 249-279.
- O'Shea BJ. 2006. Checklist of the mosses of sub-Saharan Africa (version 5,12/06). *Tropical Bryology Research Reports* **6**: 1-252.
- Oliver MJ, Velten J & Mishler BD. 2005. Desiccation tolerance in bryophytes: a reflection of the primitive strategy for plant survival in dehydrating habitats. *Integrative and Comparative Biology* **45(5)**: 788-799.
- Oliver MJ, Velten J & Wood AJ. 2000. Bryophytes as experimental models for the study of environmental stress tolerance: *Tortula ruralis* and desiccation tolerance in mosses. *Plant Ecology* **151**: 73-84.
- Paciolla C & Tommasi F. 2003. The ascorbate system in two bryophytes: *Brachythecium velutinum* and *Marchantia polymorpha*. *Biologia Plantarum* **47**: 387-393.
- Parida AK & Das AB. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60(3)**: 324-349.
- Parihar P, Singh S, Singh R, Singh VP & Prasad SM. 2015. Effects of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research International* **22(6)**: 4056-4075.
- Park YK, Koo MH, Ikegaki M & Contado JL. 1997. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* **40(1)**: 97-106.
- Pantović J & Sabovljević M. 2017. Overview of bryophyte flora research in Serbia with presentation of the Serbian BRYO database. *Botanica Serbica* **41(2)**: 153-162.
- Papp B. 2002. New records of bryophytes from a saline area of Greece. *Studia Botanica Hungarica* **33**: 21-24.
- Papp B, Alegro A, Erzberger p, Szurdoki E, Segota V & Sabovljević M. 2016. Bryophytes of saline areas in the Pannonian region of Serbia and Croatia. *Studia Botanica Hungarica* **47**: 141-150.
- Pastori GM & Foyer CH. 2002. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of „redox“ and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* **129(2)**: 460-468.
- Pejin B, Iodice C, Tommonaro G, Sabovljević M, Bianco A, Tešević V, Vajs V & De Rosa S. 2012a. Sugar composition of the moss *Rhodobryum ontariense* (Kindb.) Kindb. *Natural Product Research* **26(3)**: 209-215.
- Pejin B, Sabovljević M, Tešević V & Vajs V. 2012b. Further study of fructooligosaccharides of *Rhodobryum ontariense*. *Cryptogamie Bryologie* **33(2)**: 191-196.
- Pejin B, Savić A, Kien-Thai Y, Mojović M. 2014. Further evaluation of antiradical activity of the moss *Rhodobryum ontariense* tea using EPR and fluorescence spectroscopy. *Cryptogamie Bryologie* **35(2)**: 173-179.

- Pence V, Dunford SS & Redella S. 2006. Differential effects of abscisic acid on desiccation tolerance and carbohydrates in three species of liverworts. *Journal of Plant Physiology* **162(12)**: 1331-1337.
- Peshev D & Van den Ende W. 2013. Sugars as antioxidants in plants. In: Tuteja N (ed.), *Crop improvement under adverse conditions*, 1<sup>st</sup> edition, Springer, New York.
- Peters K, Treutler H, Döll S, Kindt ASD, Hankemeier T & Neumann S. 2019. Chemical diversity and classification of secondary metabolites in nine bryophyte species. *Metabolites* **9(10)**: 222.
- Pisarenko OY, Ignatova EA & Ignatov MS. 2001. *Entosthodon hungaricus* (Boros) Loeske (Funariaceae, Musci) in Altaisky territory, South Siberia. *Arctoa* **10**: 97-102.
- Planas-Portell J, Gallart M, Tiburco AF & Altabella T. 2013. Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* **13**: 109.
- Prigge MJ & Bezanilla M. 2010. Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development* **137(21)**: 3535-3543.
- Qudeimat E, Faltusz AM, Wheeler G, Lang D, Holtorf H, Brownlee C, Reski R & Frank W. 2008. A P1IB-type Ca<sup>2+</sup>-ATPase is essential for stress adaptation in *Physcomitrella patens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 19555-19560.
- Qui YL, Li LB, Wang B, Chen ZD, Knoop V, Groth-Malonek M, Dombrowska O, Lee J, Kent L, Rest J, Estabrook GF, Hendry TA, Taylor DW, Testa CM, Ambros M, Crandall-Stotler B, Duff RJ, Stech M, Frey W, Quandt D & Davis CC. 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 15511-15516.
- Qui YL. 2008. Phylogeny and evolution of charophytic algae and land plants. *Journal of Systematics and Evolution* **46(3)**: 287-306.
- Rajesh A, Arumugam R & Venkatesalu V. 1998. Growth and photosynthetic characteristics of *Ceriops roxburghiana* under NaCl stress. *Photosynthetica* **35(2)**: 285-287.
- Rensing SA, Rombauts S, Van de Peer Y & Reski R. 2002. Moss transcriptome and beyond. *Trends in Plant Science* **7(12)**: 535-538.
- Rensing SA, Ick J, Fawcett JA, Lang D, Zimmer A, Van de Peer Y & Reski R. 2007. An ancient genome duplication contributed to the abundance of metabolic genes in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 130.
- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin-I T, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk WB, Barker E, Bennetzen JL, Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A, Schween G, Shiu SH, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer Y, Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang L, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS & Boore JL. 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**: 64-69.



- Rensing SA, Goffinet B, Meyberg R, Wu SZ & Bezanilla M. 2020. The moss *Physcomitrium* (*Physcomitrella*) *patens*: a model organism for non-seed plants. *The Plant Cell* **32**(5): 1361-1376.
- Resemann H, Lewandowska M, Mann JG & Feussner I. 2019. Membrane lipids, waxes and oxylipins in the moss model organism *Physcomitrella patens*. *Plant and Cell Physiology* **60**(6): 1166-1175.
- Reski R. & Abel WO. 1985. Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* **165**: 354-358.
- Rezazadeh A, Ghasemneshaz A, Barani M & Telmadarrehei T. 2012. Effect of salinity on phenolic composition and antioxidant activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves. *Research Journal of Medicinal Plants* **6**(3): 245–252.
- Rhodes D & Hanson AD. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 957-984.
- Rice-Evans C, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20**(7): 933–956.
- Richards SL, Wilkins KA, Swarbreck SM, Anderson AA, Habib N, Smith AG, McAinsh M & Davies JM. 2014. The hydroxyl radical in plants: from seed to seed. *Journal of Experimental Botany* **66**(1): 37-46.
- Richardt S, Timmerhaus G, Lang D, Qudeimat E, Corrêa LG, Reski R, Rensing SA & Frank W. 2010. Microarray analysis of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionarily conserved transcriptional regulation of salt stress and abscisic acid signalling. *Plant Molecular Biology* **72**(1-2): 27–45.
- Roberts AW, Roberts EM, Haigler CHZ. 2012. Moss cell walls: structure and biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* **3**(166): 166
- Rogers ME, Grieve CM & Shannon MC. 2003. Plant growth and ion relations in lucerne (*Medicago sativa* L.) in response to the combined effects of NaCl and P. *Plant and Soil* **253**: 187-194.
- Rohde A, Prinsen E, De Rycke R, Engler G, Van Montagu M & Boerjan W. 2002. PtABI3 impinges on the growth and differentiation of embryonic leaves during bud set in poplar. *The Plant Cell* **14**(8): 1885– 1901.
- Rosa M, Prado C, Podazza G, Interdonato R, González JA, Hilal M & Prado FE. 2009. Soluble sugars – metabolism, sensing and abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* **4**(5): 388-393.
- Ruibal C, Castro A, Carballo V, Szabados L & Vidal S. 2013. Recovery from heat, salt and osmotic stress in *Physcomitrella patens* requires a functional small heat shock protein *PpHsp16.4*. *BMC Plant Biology* **13**: 174.
- Saavedra L, Svensson J, Carballo V, Izmendi D, Welin B & Vidal S. 2006. A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *The Plant Journal* **45**(2): 237-249.
- Sabovljević M & Sabovljević A. 2007. Contribution to the coastal bryophytes of the Northern Mediterranean: are there halophytes among bryophytes? *Phytologia Balcanica* **13**(2): 131-135.
- Sabovljević M, Papp B, Sabovljević A, Vujučić M, Szurdoki E & Segarra-Moragues JG. 2012. *In vitro* micropropagation of rare and endangered moss *Entosthodon hungaricus* (Funariaceae). *Bioscience Journal* **28**(4): 632-640.

- Sabovljević M, Vujičić M & Sabovljević A. 2014. Plant growth regulators in bryophytes. *Botanica Serbica* **38(1)**: 99-107.
- Sabovljević MS, Sabovljević AD, Ikram NKK, Peramuna A, Bae H & Simonsen HT. 2016a. Bryophytes – an emerging source for herbal remedies and chemical production. *Plant Genetic Resources* **14(4)**: 314-327.
- Sabovljević MS, Segarra-Moragues JG, Puche F, Vujičić M, Cogoni A & Sabovljević A. 2016b. Eco-physiological and biotechnological approach to conservation of the world-wide rare and endangered aquatic liverwort *Riella helicophylla* (Boryet Mont.) Mont. *Acta Botanica Croatica* **75(2)**: 194-198.
- Sabovljević MS, Vujičić M, Wang X, Garraffo M, Bewley CA & Sabovljević A. 2017. Production of the macrocyclic bis-bibenzyls in axenically farmed and wild liverwort *Marchantia polymorpha* L. subsp. *ruderalis* Bischl. et Boisselier. *Plant Biosystems* **151**: 414-418.
- Sabovljević MS, Nikolić N, Vujičić M, Šinžar-Sekulić J, Pantović J, Papp B & Sabovljević A. 2018. Ecology, distribution, propagation *in vitro*, *ex situ* conservation and native population strengthening of rare and threatened halophyte moss *Entosthodon hungaricus* in Serbia. *Wulfenia* **25**: 117-130.
- Saidi Y, Finka A, Muriset M, Bromberg Z, Weiss YG, Maathuis FJM & Goloubinoff P. 2009. The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane. *The Plant Cell* **21(9)**: 2829–2843.
- Sairam RK & Tyagi A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* **86(3)**: 407-421.
- Sakata Y, Komatsu K & Takezawa D. 2014. ABA as universal plant hormone. In Lüttge U, Beyschlag W and Cushman J (eds.) *Progress in Botany*, 75, pp. 57-96. *Progress in Botany (Genetics-Physiology-Systematics-Ecology)*, Springer, Berlin, Germany.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C & Harper JF. 2002. Calcium at the crossroads of signalling. *The Plant Cell* **14(Suppl)**: e401-417.
- Savidge R. 1996. Xylogenesis, genetic and environmental regulation. *International Association of Wood Anatomists / IAWA Journal* **17(3)**: 269-310.
- Scarse-Field SA & Knight MR. 2003. Calcium: just a chemical switch? *Current Opinion in Plant Biology* **6(5)**: 500-506.
- Schofield WB. 2002. *Introduction to bryology*. Oregon State University Press, Oregon USA
- Schnepf E & Reinhard C. 1997. Brachycytes in *Funaria* protonemate: induction by abscisic acid and fine structure. *Journal of Plant Physiology* **151(2)**: 166–175.
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JAD & McCarty DR. 1997. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276(5320)**: 1872–1874.
- Segal AW & Abo A. 1993. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends in Biochemical Sciences* **18(2)**: 43–47.
- Seo M & Koshiha T. 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **7(1)**: 41-48.
- Sgherri C, Cosi E & Navarri-Izzo F. 2003. Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiologia Plantarum* **118(1)**: 21–28.

- Shabala L, Cuin TA, Newman I & Shabala S. 2005. Salinity-induced ion flux patterns from the excised roots of *Arabidopsis* sos mutants. *Planta* **222**(6): 1041-1050.
- Shao HB, Liang ZS, Shao MA & Sun Q. 2005. Dynamic changes of antioxidative enzymes of 10 wheat genotypes at soil water deficits. *Colloids and Surfaces. B Biointerfaces* **42**(3-4): 187-195.
- Sharma A, Slathia S, Gupta D, Handa N, Choudhary SP, Langer A & Bhardwaj R. 2015. Antifungal and antioxidant profile of ethnomedicinally important liverworts (*Pellia endivaefolia* and *Plagiochasma appendiculatum*) used by indigenous tribes of district Reasi: North West Himalayas. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* **85**: 571-579.
- Sharma KD & Nayyar H. 2016. Regulatory networks in pollen development under cold stress. *Frontiers in Plant Science* **7**: 402.
- Singh KN & Chatrath R. 2001. Salinity tolerance. In: Reynolds MP, Ortiz-Monasterio JJ, McNab A, (eds.), pp.101-110. Application of physiology in wheat breeding. Mexico: CIMMYT
- Singh AK & Dubey RS. 1995 Changes in chlorophyll a and b contents and activities of photosystems 1 and 2 in rice seedlings induced by NaCl. *Photosynthetica* **31**(4): 489– 499.
- Singleton VL & Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: 144-158.
- Sirichandra C, Gu D, Hu HC, Davanture M, Lee S, Djaoui M, Valot B, Zivy M, Leung J, Merlot S & Kwak JM. 2009. Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Letters* **583**(18): 2982-2986.
- Sivakumar P, Sharmila P, Jain V & Pardha-Saradhi P. 2002. Sugars have potential to curtail oxygenase activity of Rubisco. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **298**(2):247–250.
- Shaw AJ, Szövényi P & Shaw B. 2011. Bryophyte diversity and evolution: Windows into the early evolution of land plants. *American Journal of Botany* **98**(3): 352-369.
- Smirnoff N. 1992. The carbohydrates of bryophytes in relation to desiccation tolerance. *Journal of Bryology* **17**(2): 185-191.
- Soriano G, Del-Castillo-Alonso MA, Monforte, Núñez-Olivera E & Martínez-Abaigar J. 2018. Phenolic compounds from different bryophyte species and cell compartments respond specifically to ultraviolet radiation, but not particularly quickly. *Plant Physiology and Biochemistry* **134**: 137-144.
- Söderlund S, Forsberg A & Pedersen M. 1988. Concentrations of cadmium and other metals in *Fucus vesiculosus* L. and *Fontinalis dalearica* Br.Eur. From the northern Baltic Sea and the Southern Bothnian Seas. *Environmental Pollution* **51**(3): 197-212.
- Spasojević I, Mojović M, Blagojević D, Spasić SD, Jones DR, Nikolić-Kokić A & Spasić MB. 2009. Relevance of the capacity of phosphorylated fructose to scavenge the hydroxyl radical. *Carbohydrate research* **344**(1): 80-84.
- Srivastava P & Kumar R. 2014. Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences* **22**(2): 123-131.
- Steffen-Heins A & Steffens B. 2015. EPR spectroscopy and its use *in planta* – a promising technique to disentangle the origin of specific ROS. *Frontiers in Environmental Science* **3**(15): 1-6.

- Steiner M. 1934. To the ecology of the salt march of the Nordostlichen united countries of Nordamerika. *Jahrbuch Know Offered* **81**: 94.
- Stepien P & Klobus G. 2005. Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. *Physiologia Plantarum* **125**(1): 31-40.
- Stevenson SR, Kamisugi Y, Trinh CH, Schmutz J, Jenkins JW, Grimwood J, Muchero W, Tuskan GA, Rensing SA, Lang D, Reski R, Melkonian M, Rothfels CJ, Li F-W, Larsson A, Wong GK-S, Edwards TA & Cuming AC. 2016. Genetic analysis of *Physcomitrella patens* identifies ABSCISIC ACID NON-RESPONSIVE, a regulator of ABA responses unique to basal land plants and required for desiccation tolerance. *The Plant Cell* **28**: 1310–1327.
- Stewart GR & Larher 1980. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. In: Mifflin BJ (ed.), 5. The biochemistry of plants: a comprehensive treatise, New York (NY): Academic Press.
- Stikić R & Jovanović Z. 2012. Fiziologija stresa biljaka. Poljoprivredni fakultet, Univerziteta u Beogradu, Beograd.
- Stoyanova S, Geuns J, Hideg E & Van den Ende W. 2011. The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **62**(3):207–214.
- Sunkar R, Bartels D & Kirch HH. 2003. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves salt tolerance. *The Plant Journal* **35**(4): 452-456.
- Svendsen AB & Verpoorte R. 1983. Chromatography of alkaloids. New York: Elsevier Scientific Publishing Company.
- Szabolcs I. 1974. Salt affected soils in Europe. The Hague: Martinus Nijhoff
- Takagi H. 2008. Proline as stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **81**(2): 211-223.
- Takahama U. 1993. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics by ascorbic acid – different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferyl alcohol by the apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidase from *Vigna angularis*. *Plant and Cell Physiology* **34**: 809-811.
- Takemiya A, Inoue S, Doi M, Kinoshita T & Shimazaki K. 2005. Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *The Plant Cell* **17**: 120-127.
- Takezawa D & Minami A. 2004. Calmodulin-binding proteins in bryophytes: identification of abscisic acid-, cold- and osmotic stress-induced genes encoding novel membrane-bound transporter-like proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **317**(2): 428-436.
- Takezawa D, Kenji K & Sakata Y. 2011. ABA in bryophytes: how a universal growth regulator in life became a plant hormone. *Journal of Plant Research* **124**(4): 437–453.
- Takezawa D, Watanabe N, Ghosh TK, Saruhashi M, Suzuki A, Ishiyama K, Somemiya S, Kobayashi M & Sakata Y. 2015. Epoxycarotenoid-mediated synthesis of abscisic acid in *Physcomitrella patens* implicating conserved mechanisms for acclimation to hyperosmosis in embryophytes. *New Phytologist* **206**(1): 209-219.
- Taiz L & Zeiger E. 2010. Plant physiology. Fifth Edition. Sinauer Associates, Inc.

- Tester M & Davenport R. 2003. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of Botany* **91(5)**: 503-527.
- Thompson K. 1978. The occurrence of buried viable seeds in relation to environmental gradients. *Journal of Biogeography* **5**: 425-430.
- Tusevski O, Kostovska A, Iloska A, Trajkovska Lj & Gadzovska Simić S. 2014. Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. *Central European Journal of Biology* **9**: 888-900.
- Umezawa T, Nakashima K, Miyakawa T, Kuromori T, Tanokura M, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K. 2010. Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant and Cell Physiology* **51(11)**: 1821-1839.
- Ungar IA. 1991. Ecophysiology of vascular halophytes. Boca Raton (FL): CRC Press
- Vanderpoorten A & Goffinet B. 2008. The barriers to oceanic island radiation in bryophytes: insights from the phylogeography of the moss *Grimmia montana*. *Journal of Biogeography* **35**: 654-663.
- Vargas MVM, Minozzo MM, Periera AB & Victoria FC. 2017. Growth and development of halophyte *Funaria hygrometrica* Hedw. (Funariaceae) under salt stress. *Bioscience Journal* **33(6)**: 1617-1621.
- Veljić M, Vukov D & Sabovljević M. 2018. Biologija briofita I: Morfologija i sistematika. Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, Beograd.
- Veljović-Jovanović S, Kukavica B, Cvetić T, Mojović M & Vučinić Ž. 2005. Ascorbic acid and the oxidative processes in pea root cell wall isolates. *Annals of the New York Academy Science* **1048**: 500-504.
- Vujičić M, Sabovljević M, Milošević S, Nikolić N & Sabovljević A. 2014. Effects of NaCl on proline and free amino acid concentration in bryophytes *Entosthodon hungaricus* and *Physcomitrella patens* *in vitro*. The Third Balkan Scientific Conference on Biology, Plovdiv, Bulgaria, May 30–June 1, 2014. Book of Abstracts: pp. 73.
- Vujičić M, Sabovljević M, Ćosić M, Maksimović V, Mišić D & Sabovljević A. 2015. Do sugar contents in selected moss species imply to their salt resistance? Twelfth Croatian Biological Congress with International participation, September 18-23, 2015, Sveti Martin na Muri, Croatia. Book of Abstracts, pp. 223.
- Vujičić MM. 2016. Biohemijski i ekofiziološki odgovor odabranih vrsta mahovina na kontrolisani stres izazvan solima u akseničnim uslovima. Doktorska disertacija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Vujičić MM, Sabovljević AD, Milošević SM, Segarra-Moragues JG & Sabovljević MS. 2016. Effects of abscisic acid (ABA) on the development of selected bryophyte species. *Plant Biosystems* **150(5)**: 1023–1029.
- Vujičić MM, Milošević SM, Sabovljević MS & Sabovljević AD. 2017. Effect of ABA treatment on activities of antioxidative enzymes in selected bryophyte species. *Botanica Serbica* **41**:11–15.
- Wagner H & Bladt S. 1996. Plant drug analysis: a thin layer chromatographic atlas, 2. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Wallace G & Fry SC. 1994. Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cytology* **151**: 229-267.

- Wang W, Vinocur B & Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperature: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.
- Wang X, Lui Z & Yikun H. 2008a. Responses and tolerance to salt stress in bryophytes. *Plant Signaling and Behavior* 3(8): 516-518.
- Wang X, Yang P, Gao Q, Lui X, Kuang T, Shen S, & He Y. 2008b. Proteomic analysis of the response to high salinity stress in *Physcomitrella patens*. *Planta* 228(1): 167-177.
- Wang X, Kuang T & He Y. 2010. Conservation between higher plants and the moss *Physcomitrella patens* in response to the phytohormone abscisic acid: a proteomics analysis. *BMC Plant Biology* 10: 192.
- Wang X, Liu Y & Yang P. 2012. Proteomic studies of the abiotic stresses response in model moss - *Physcomitrella patens*. *Frontiers in Plant Science* 3: 258.
- Wang X, Cao J, Dai X, Xiao J, Wu Y & Wang Q. 2018. Total flavonoid concentrations of bryophytes from Tianmu Mountain, Zhejiang Province (China): Phylogeny and ecological factors. *PLOS ONE* 12(3): e0179837.
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei dit Frey N & Leund J. 2008. An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular Plant* 1(2): 198-217.
- Waškiewicz A, Muzolf-Panek M & Goliński P. 2013. Phenolic content changes in plants under salt stress. In: Ahmad P, Azooz M, Prasad M (eds.), *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*. New York (NY): Springer.
- Waterman MJ, Nugraha AS, Hendra R, Ball GE, Robinson SA & Keller PA. 2017. Antarctic moss biflavonoids show high antioxidant and ultraviolet-screening activity. *Journal of Natural Products* 80(8): 2224–2231.
- Weber DJ. 2008. Adaptive mechanisms of halophytes in desert regions. In: *Salinity and water stress*, pp. 179-185. Springer Netherlands, Netherlands.
- Werner O, Ros Espín RM, Bopp M & Atzorn R. 1991. Abscisic-acid induced drought tolerance in *Funaria hygrometrica* Hedw. *Planta* 186(1): 99-103.
- Wilson MA, Sawyer J, Hatcher PG & Lerch HE III. 1989. 1,3,5-Hydroxybenzene structures in mosses. *Phytochemistry* 28: 1395-1400.
- Wood AJ & Oliver MJ. 2004. Molecular biology and genomics of the desiccation tolerant moss *Tortula ruralis*. In: Wood AJ, Oliver MJ, Cove DJ (eds.). *New frontiers in bryology: physiology, molecular biology, and functional genomics*. Dordrecht/Boston (MA): Kluwer Academic.
- Wu K, Rooney MF & Ferl RJ. 1997. The Arabidopsis 14-3-3 multigene family. *Plant Physiology* 114: 1421-1431.
- Wu H & Li Z. 2019. The importance of Cl<sup>-</sup> exclusion and vacuolar Cl<sup>-</sup> sequestration: revisiting the role of Cl<sup>-</sup> transport in plant salt tolerance. *Frontiers in Plant Science* 10: 1418.
- Xiang L, Le Roy K, Bolouri-Moghaddam MR, Vanhaecke M, Lammens W, Rolland F & Van den Ende W. 2011. Exploring the neutral invertase—oxidative stress defence connection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 62: 1871–1885.
- Xiaowei G. 2007. Chemistry of bryophytes. Doctoral thesis, Department of Chemistry, National University of Singapore.



- XinWen X, Hailiang X, Yangling W, Xiaojing W, Yongzhi Q & Bo X. 2008. The effect of salt stress on the chlorophyll level of the main sand – binding plants in the shelterbelt along the Tarim Desert Highway. *Chinese Science Bulletin* **53**: 109-111.
- Xiong L & Zhu JK. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment* **25**(2): 131-139.
- Xiong L, Wang RG, Mao G & Koczan JM. 2006. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiology* **142**(3): 1065-1074.
- Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 781–803.
- Yayintas OT, Sogut O, Konyalioglu S, Yilmaz S & Tepeli B. 2017. Antioxidant activities and chemical composition of different extracts of mosses gathered from Turkey. *AgroLife Scientific Journal* **6**(2): 205-213.
- Yazaki K, Arimura G & Ohnishi T. 2017. 'Hidden' terpenoids in plants: their biosynthesis, localization and ecological roles. *Plant and Cell Physiology* **58**(10): 1615-1521.
- Yokoi S, Quintero FJ, Cubero B, Ruiz MT, Bressan RA, Hasegawa PM & Pardo JM. 2002. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters in the salt stress response. *The Plant Journal* **30**(5): 529-539.
- Yonekura-Sakakibara K, Higashi Y & Nakabayashi R. 2019. The origin and evolution of plant flavonoid metabolism. *Frontiers in Plant Science* **10**: 943.
- Young J. 1991. The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum* **83**(4): 702–708.
- Youssef AM. 2009. Salt tolerance mechanisms in some halophytes from Saudi Arabia and Egypt. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* **5**(3): 191-206.
- Yu L, Nie J, Cao C, Jin Y, Yan M, Wang F, Liu J, Xiao Y, Liang Y & Zhang W. 2010. Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **188**(3): 762-773.
- Yuan G, Wang X, Guo R & Wang Q. 2010. Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. *Food Chemistry* **121**(4): 1014-1019.
- Yuanyuan M, Yali Z, Lu J & Hongbo S. 2009. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *African Journal of Biotechnology* **8**(10): 2004-2010.
- Zander RH. 1993. *Hennediella heimii*. *Bulletin of the Buffalo Society of Natural Sciences* **32**: 248.
- Zechmesiter HG. 2005. Bryophytes of continental salt meadows in Austria. *Journal of Bryology* **27**(4): 297-302.
- Zhang X, Garreton V & Chua NH. 2005. The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation. *Genes and Development* **19**(13): 1532–1543.
- Zhang Y, Liu X, Zhang K, Zhang D & Guan K. An ABSCISIC ACID INSENSITIVE3-like gene from the desert moss *Syntrichia caninervis* confers abiotic stress tolerance and reduces ABA sensitivity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **133**: 417-435.

- Zhao M, Li Q, Chen Z, Lv Q, Bao F, Wang X & He Y. 2018. Regulatory mechanism of ABA and ABI3 on vegetative development in the moss *Physcomitrella patens*. *International Journal of Molecular Sciences* **19(9)**: 2728.
- Zhu JK. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* **6**: 66-71.
- Zhu JK. 2004. Plant salt tolerance and the SOS pathway. In: Proceedings of the XLVIII Italian Society of Agricultural Genetics: SIFV-SIGA Joint Meeting, Lecce, Italy, ISBN 88-9000622-5-8.
- Zhu JK. 2007. Plant salt stress. Encyclopedia of life sciences. Chichester: John Wiley & Sons.
- Zúñiga-González P, Zúñiga GE, Pizzaro M, Casanova-Katny A. 2016. Soluble carbohydrate content variation in *Sanionia unciata* and *Polytrichum alpinum*, two Antarctic mosses with contrasting desiccation capacities. *Biological Research* **49**: 6.

## **Biografija autora**

Marija Ćosić rođena je 18.10.1991. godine u Užicu, a osnovnu školu i gimnaziju je završila u Arilju. Osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru biologija je završila 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,37. Master akademske studije završila je 2015. godine sa prosečnom ocenom 10,00, odbranivši Master rad sa ocenom 10. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijski program Biologija, modul Fiziologija i molekularna biologija biljaka) je upisala 2015/16. godine. Sve ispite na doktorskim studijama je položila u roku sa prosečnom ocenom 9,90.

U periodu od 2016. do aprila 2018. godine Marija Ćosić je bila doktorand stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, angažovana na Biološkom fakultetu u okviru projekta OI 173024. Od aprila 2018. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na Katedri za fiziologiju biljaka Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od juna 2019. godine izabrana je u zvanje istraživač saradnik, a svoje aktivnosti ostvaruje u okviru postojećeg projekta OI 173024, kao i u okviru bilateralnog projekta Republika Srbija – Republika Hrvatska. Do sada je objavila tri naučna rada na kojima je prvi autor i šest saopštenja sa skupova međunarodnog i jedno saopštenje sa skupova nacionalnog značaja.

Marija Ćosić od 2015. godine učestvuje u izvođenju praktične nastave na tri obavezna i dva izborna kursa na osnovnim akademskim studijama na Katedri za fiziologiju biljaka, dok u martu 2021. godine stiče zvanje asistenta. Od 2019. godine učestvuje u održavanju seminara Biologije u Istraživačkoj stanici Petnica.

Član je Društva za fiziologiju biljaka Srbije, Srpskog biološkog društva i Bryological Association of South Eastern Europe (BASEE).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

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

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Прилог 3.**

## **Изјава о коришћењу**

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

---

---

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



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